



HAL
open science

Etude de la dynamique conformationnelle d'un récepteur-canal pentamérique par fluorescence

Anaïs Menny

► **To cite this version:**

Anaïs Menny. Etude de la dynamique conformationnelle d'un récepteur-canal pentamérique par fluorescence. Biochimie [q-bio.BM]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066082 . tel-01802085

HAL Id: tel-01802085

<https://theses.hal.science/tel-01802085>

Submitted on 29 May 2018

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.

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE
ET MARIE CURIE

Présentée par
Anaïs MENNY

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Pierre et Marie Curie
Spécialité : Biochimie

Etude de la dynamique conformationnelle d'un
récepteur-canal pentamérique par
fluorescence

Dr GRUTTER Thomas	Rapporteur
Dr RONDARD Philippe	Rapporteur
Dr BAADEN Marc	Examineur
Dr DELEPIERRE Muriel	Examinatrice
Pr VENIEN-BRYAN Catherine	Examinatrice
Dr CORRINGER Pierre-Jean	Directeur de thèse

Thèse effectuée au sein du groupe Récepteurs-Canaux à l'Institut Pasteur de Paris
Ecole doctorale Cerveau, Cognition, Comportement

Résumé

Les récepteurs canaux pentamériques (RCPs) assurent la transmission synaptique dans le système nerveux, via des réorganisations structurales allostériques globales couplant la liaison de neurotransmetteur à l'ouverture et à la désensibilisation du canal ionique.

Sur le RCP bactérien modèle GLIC, j'ai suivi ces changements conformationnels à plusieurs endroits de la protéine, par incorporation de couples fluorophore/quencher (bimane/tryptophane). Les données en détergent et en liposomes, à l'équilibre et en cinétique, m'ont permis d'identifier, et de caractériser structuralement, un intermédiaire rapide (milliseconde) de pré-activation, montrant une réorganisation majeure du domaine synaptique suite à l'application d'agoniste, mais où le pore reste fermé, et ainsi de proposer un modèle global des transitions d'activation et de désensibilisation.

En combinant mutagenèse, électrophysiologie et approches structurales, j'ai également identifié une région critique, à l'interface entre les domaines extracellulaires et transmembranaires, pour l'activation et la désensibilisation. Enfin, un criblage fonctionnel m'a permis d'identifier de nouveaux modulateurs allostériques de GLIC.

Mon travail de thèse contribue donc à la compréhension du mécanisme allostérique de GLIC, et présente de nouveaux outils pour l'étude des récepteurs du système nerveux humain.

Summary

Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) are responsible for the synaptic transmission in the nervous system, occurring through their structural reorganizations allosterically coupling neurotransmitter binding to the opening or desensitization of the ion channel.

Using the bacterial pLGIC model GLIC, I followed these conformational changes in several regions of the protein, through the incorporation of fluorophore / quencher pairs (bimane / tryptophan). The acquisition of data in detergent and liposomes, at equilibrium and in real time, allowed me to identify and structurally characterize a fast (millisecond) pre-activation intermediate. This new intermediate state is characterized by a major reorganization of the synaptic domain following agonist application, but with a closed pore, thus providing a comprehensive model for activation transitions and desensitization.

Combining mutagenesis, electrophysiological and structural approaches, I also identified a critical region at the interface between the extracellular and transmembrane domains for activation and desensitization. Finally, a functional screening allowed me to identify new allosteric modulators of GLIC.

This work contributes to the understanding of the allosteric mechanism of GLIC, and provides a structural template as well as new tools for the study of receptors in the human nervous system.

Table des matières

I. INTRODUCTION	15
1. Considérations générales	15
1.1 La synapse	15
1.2 Les récepteurs ionotropiques à la synapse	16
2. Les récepteurs-canaux pentamériques	19
2.1 Famille	20
2.2 Diversité des RCPs	22
2.3 Distribution et fonction	24
2.4 Pathologies et cibles pharmacologiques	26
3. Fonctionnement des récepteurs-canaux	31
3.1 Caractérisations électrophysiologiques	31
3.2 Modèles thermodynamiques	33
3.2.1 Modèle MWC	33
3.2.2 Modèle KNF	35
3.2.3 Les RCPs, des protéines allostériques	36
3.3 Modèles cinétiques d'activation	38
3.3.1 Le modèle FLIP	40
3.3.2 Le modèle PRIME	41
3.3.3 Rate Equilibrium Free-Energy Relationship (REFER)	42
4. Etude du récepteur-canal bactérien, GLIC	45
4.1 Caractérisation fonctionnelle de GLIC	45
4.1.1 Activation	45
4.1.2 Désensibilisation	46
4.2 Structures à haute résolution de GLIC	47
4.2.1 Structure obtenue à pH7	48
4.2.2 Structure à pH4	49
4.2.3 Une troisième conformation de GLIC localement fermée	51
4.3 Un modèle de transition	52
5. Structures de RCPs	55
5.1 Etat des connaissances	55
5.2 Structures type repos	56
5.3 Structures type actif	58

5.4 Structure type désensibilisée	59
5.5 Autres conformations	61
5.6 Transitions structurales déduites des structures	62
5.6.1 Transitions du récepteur GluCl α	62
5.6.2 Transition du récepteur glycine	64
6. Modulateurs des RCPs	67
6.1 Benzodiazépines	67
6.2 Anesthésiques généraux et alcool	68
6.3 Lipides	71
6.4 Bloquants du canal	73
6.5 Ions divalents et acide cafféique	74
7. Etudes dynamiques des transitions allostériques des RCPs	77
7.1 Etudes par résonance magnétique nucléaire	77
7.2 Etudes par dynamique moléculaire	79
7.3 Etudes par résonance paramagnétique électronique	83
8. La fluorescence dans l'étude des réorganisations structurales des RCPs	87
8.1 Aspects théoriques	87
8.1.1 Définition de la fluorescence	87
8.1.2 Effets de l'environnement	88
8.2 Utiliser la fluorescence pour l'étude des réorganisations structurales des RCPs	90
8.2.1 Transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET)	90
8.2.2 Mesures de quenching, cas particulier du « tryptophan induced quenching » (TrIQ)	94
8.2.3 Les fluorophores comme senseurs de l'environnement, cas particulier de la voltage-clamp fluorométrie (VCF)	97
8.3 Problématiques restantes et projet de thèse principal	102
IV. RESULTATS	107
1. Méthodes	109
2. Projet 1 : Etude des réorganisations structurales de GLIC par fluorescence	117
2.1 Préface	117
2.2 Introduction	118
2.3 Développement technique de la méthode TrIQ sur GLIC	120
2.3.1 Choix du fluorophore et sa caractérisation	120
2.3.2 Choix des positions pour suivre les réorganisations structurales de GLIC	121
2.3.3 Estimation du taux de marquage et bruit de fond	123
2.4 Analyse des paires de quenching en détergent	125
2.4.1 Variations de fluorescence en haut et au milieu du domaine extracellulaire	126

2.4.2 Variations de fluorescence en bas du domaine extracellulaire	130
2.4.3 Variations de fluorescence à l'interface entre domaines extracellulaire et transmembranaire	131
2.4.4 Variations de fluorescence dans le domaine transmembranaire	133
2.4.5 Variations de fluorescence dans la région intracellulaire	135
2.5 Comparaison des réorganisations observées en détergent et en liposomes	136
2.6 Caractérisation fonctionnelle des mutants de GLIC marqués au bimane	139
2.7 Enregistrements des variations de fluorescence en temps réel	145
2.8 Discussion	150
2.8.1 Description des réorganisations structurales de GLIC et comparaisons avec les structures connues	150
2.8.2 Insensibilité de GLIC à son environnement membranaire	156
2.8.3 Evidences de l'existence d'un intermédiaire de pré-activation	157
2.8.4 Réorganisations structurales au cours de la désensibilisation	161
2.9 Perspectives	162
3. Projet 2 : Identification d'une région critique pour l'activation et la désensibilisation de GLIC	167
3.1 Préface	167
3.2 Introduction	168
3.3 Identification d'une région charnière pour l'activation de GLIC	170
3.3.1 Caractérisations fonctionnelles	170
3.3.2 Structures des mutants du pré-M1	172
3.4 Etat des lieux des connaissances sur la désensibilisation de GLIC	175
3.5 Caractérisation électrophysiologique de la désensibilisation de GLIC	176
3.5.1 Etude du récepteur sauvage	176
3.5.2 Mutations dans la région du pré-M1 et de l'hélice M1	181
3.5.3 Variabilité de la désensibilisation apparente de GLIC et de ses mutants	184
3.6 Etude structurale du mutant P250C-Y197F	186
3.7 Discussion générale et modèle structural	188
4. Projet 3 : Crible par électrophysiologie de composés ciblant la poche intra-sandwich de GLIC	195
4.1 Préface	195
4.2 Introduction	196
4.3 Réactifs ciblant les cystéines	197
4.4 Identification des cavités et crible virtuel	199
4.5 Test des composés sélectionnés par le crible virtuel	201
4.5.1 Remarques d'ordre technique	201
4.5.2 Identification de composés inhibiteurs	203
4.5.3 Identification de composés potentialisateurs	204

4.6 Conclusions et expériences futures	208
5. Discussion générale	213
V. BIBLIOGRAPHIE	219
VI. ANNEXES	245

Abréviations

5-HT₃R : Récepteur à la sérotonine

AG : Anesthésique Général

AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate

BBs : Bimane sel de Bunte

BDZ : Benzodiazépines

CHO : Cellule d'ovaire de hamster chinois (Chinese Hamster Ovary)

DDM : n-Dodecyl β -D-maltoside

DEER : Résonance Double Electron-Electron

DTT : Dithiotréitol

ECD : Domaine Extracellulaire

ELIC : *Erwinia chrysanthemi* Ligand-gated Ion Channel

FRET : Transfert d'Énergie par Résonance de type Förster

GABA : Acide γ -aminobutyrique

GABA_AR : Récepteur au GABA

GFP : Green Fluorescent Protein

GLIC : *Gloeobacter violaceus* Ligand-gated Ion Channel

GluCl : Glutamate-gated Chloride Channel

GlyR : Récepteur à la Glycine

HEK : Cellule embryonnaire de rein humain (Human Embryonic Kidney)

HisCl : Histamine-gated Chloride Channel

ICD : Domaine intracellulaire

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

mBBr : Mono Bromobimane

MBP : Maltose Binding Protein

MMTS : methyl methanethiosulfonate

nAChR : Récepteur nicotinique à l'AcétylCholine

NMDA : N-methyl-D-aspartate

PBS : Phosphate Buffer Saline

PFA : ParaFormAldéhyde

PTX : Picrotoxine

RCP : Récepteur-Canal Pentamérique

RT : Température ambiante

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RMSD : Root Mean Square Deviation

RPE : Résonance Paramagnétique Electronique

TMD : Domaine transmembranaire

Trp/Tyr IQ : Quenching induit pas les Tryptophanes/Tyrosines

VCF : Voltage-Clamp Fluorométrie

ZAC : Zinc Activated Channel

I. Introduction

1. Considérations générales

1.1 La synapse

La communication neuronale dans le système nerveux central et périphérique s'effectue à travers des zones de contact appelées synapses. La synapse chimique est définie par 1) l'extrémité d'un axone, le plus souvent, du neurone appelé pré-synaptique, 2) la zone membranaire de contact du neurone (ou autre cellule) post-synaptique, 3) l'espace interstitiel entre les deux cellules appelé fente synaptique (Figure 1.1). Lorsqu'un potentiel d'action arrive à l'extrémité pré-synaptique, l'activation de récepteurs voltage-dépendants entraîne une entrée de Ca^{2+} qui aboutit, par exocytose, au relargage dans la fente synaptique de molécules appelées neurotransmetteurs. La fente synaptique étant très fine, la concentration locale en neurotransmetteurs est très élevée et atteint des valeurs de l'ordre de 10^{-3}M (Scimemi and Beato, 2009). Ces neurotransmetteurs diffusent au sein de la fente synaptique et se lient aux récepteurs membranaires situés sur la membrane post-synaptique, stabilisant ainsi leur état activé. L'activation de ces récepteurs post-synaptiques signifie une ouverture de leur canal membranaire et ainsi l'entrée passive d'ions, cations ou anions selon le type de récepteurs, dans le cytoplasme de la cellule post-synaptique. Le changement de concentration en ions dans cette cellule entraîne une modification de son potentiel membranaire. Une synapse sera inhibitrice si la membrane post-synaptique est hyperpolarisée, et excitatrice si la membrane est dépolarisée, favorisant ou inhibant ainsi la génération d'un nouveau potentiel d'action qui, à son tour, sera propagé jusqu'à la prochaine synapse.

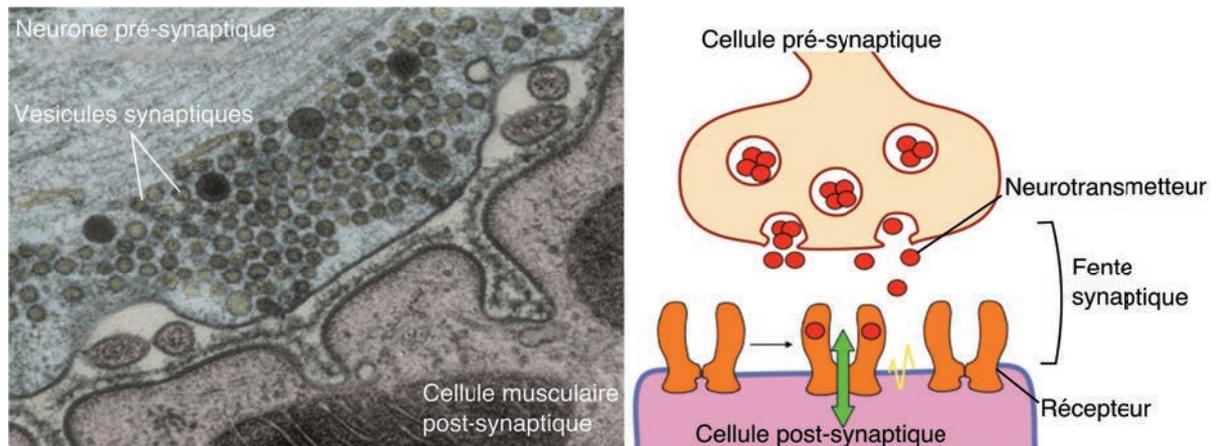


Figure 1.1 : La synapse. L'image de gauche montre un cliché de microscopie électronique à transmission, d'une synapse neuromusculaire. La coloration est artificielle pour permettre de différencier le neurone (bleu) de la cellule musculaire (rose) (Oxford journal, issue August 2011). A droite est représenté un schéma d'une synapse faisant figurer le relargage de neurotransmetteurs contenus dans des vésicules synaptiques et leur liaison aux récepteurs post-synaptiques.

1.2 Les récepteurs ionotropiques à la synapse

Dans le système nerveux central et à la jonction neuromusculaire, la transmission synaptique rapide est assurée par les récepteurs ionotropiques. Ces protéines transmembranaires sont divisées en trois catégories principales (Collingridge et al., 2009) : la superfamille des récepteurs-canaux pentamériques (Dent, 2010), la superfamille des récepteurs tétramériques ionotropiques au glutamate (Kumar and Mayer, 2013) et la famille des récepteurs trimériques P2X (Habermacher et al., 2015) (Figure 1.2).

Les récepteurs P2X

De part leur rôle dans la transmission synaptique, les récepteurs ionotropiques sont essentiels à de nombreux procédés physiologiques mais également impliqués dans de multiples pathologies.

Brièvement, les récepteurs P2X ont un rôle dans la neurogénèse et la neuro-plasticité, et sont impliqués dans la sensibilité à la douleur et dans

le processus d'inflammation (Beamer et al., 2015; Oliveira et al., 2015). Ils ont également un rôle modulateur sur le relargage des neurotransmetteurs ainsi que sur l'expression, la localisation et la fonction des récepteurs-canaux pentamériques (Emerit et al., 2016). Leur dysfonctionnement implique donc un large spectre de pathologies et ils sont également impliqués dans divers troubles psychiatriques tels que la dépression et la schizophrénie (Burnstock and Kennedy, 2011; Tewari and Seth, 2015).

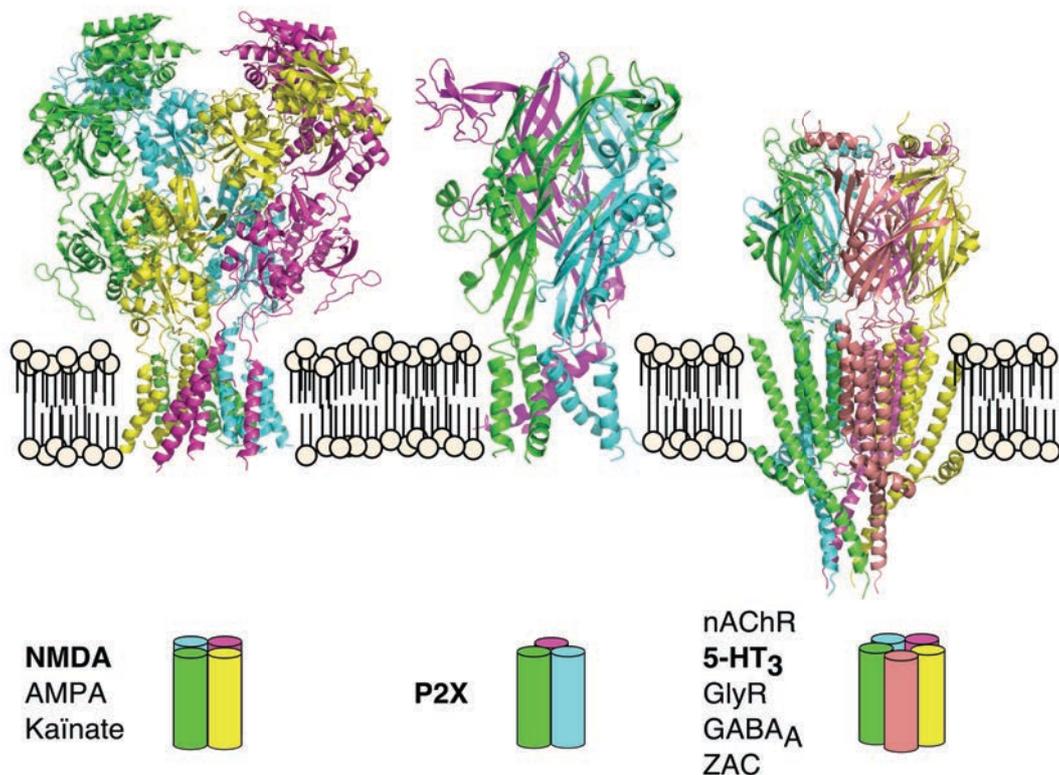


Figure 1.2 : Récepteurs ionotropiques. Structures représentatives des trois classes de récepteurs ionotropiques, faisant figurer la structure du récepteur NMDA (Karakas and Furukawa, 2014), du récepteur P2X (Hattori and Gouaux, 2012) et du récepteur 5-HT₃ (Hassaine et al., 2014).

Les récepteurs au glutamate

Les récepteurs ionotropiques au glutamate sont responsables de la majorité de la transmission excitatrice au sein du système nerveux. Ils sont divisés en trois groupes : les récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA

et les récepteurs Kainate (Smart and Paoletti, 2012). Cette superfamille de récepteurs à un rôle dans de nombreux processus physiologiques. En effet, leur diversité génétique et post-translationnelle, couplé à leur sensibilité à différents ligands et au voltage membranaire fait de ces récepteurs les acteurs majeurs de la régulation excitatrice rapide (Traynelis et al., 2010). Cela leur confère d'autre part un rôle dans la modulation des signaux excitateurs sur des temps plus longs, essentiels à la neuro-plasticité, et par extension à la mémoire (Chater and Goda, 2014). On peut également citer leur rôle dans le développement neuronal, et plus particulièrement, pour les récepteurs NMDAs, un rôle dans la neuro-cytotoxicité consécutive à des traumatismes. Ces récepteurs sont donc des cibles thérapeutiques majeures, notamment dans le traitement de maladies neuro-dégénératives telles que Parkinson, ou encore dans les pathologies impliquant une perte de mémoire telle que la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 2014).

2. Les récepteurs-canaux pentamériques

Les récepteurs-canaux pentamériques (RCPs) sont composés de 5 sous-unités identiques (homopentamères) ou homologues (hétéropentamères). Chaque sous-unité comporte un domaine extracellulaire (ECD) organisé en sandwich β , un domaine transmembranaire (TMD) composé de 4 hélices α et un domaine intracellulaire (ICD) (Figure 2.1).

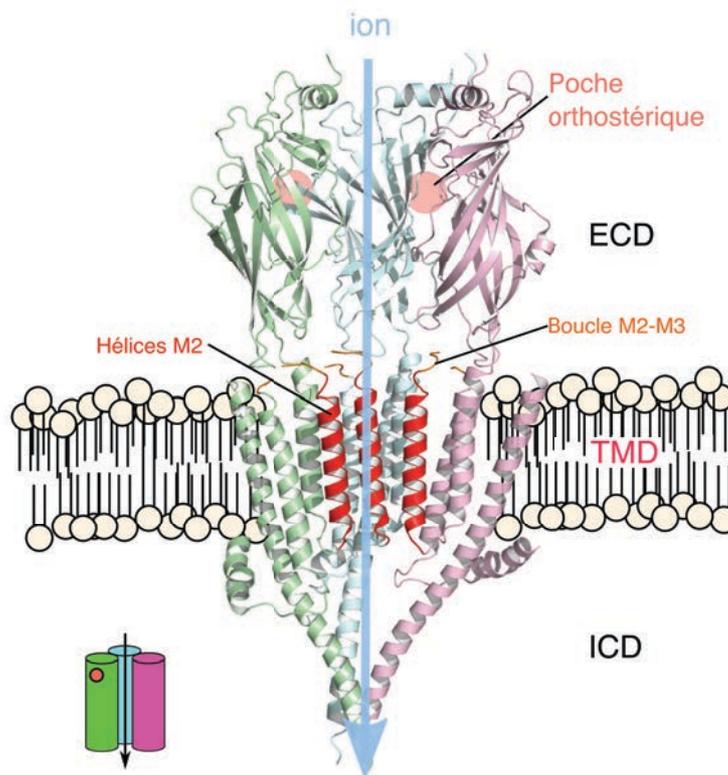


Figure 2.1 : Structure d'un récepteur canal pentamérique, le récepteur 5-HT₃. Seules trois sous-unités sont représentées pour plus de clarté. Le récepteur est organisé en trois domaines : le domaine extracellulaire, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire. Le récepteur 5-HT₃ présente un domaine intracellulaire partiellement digéré à la trypsine et donc incomplet, mais c'est le seul récepteur cristallisé à ce jour avec ce domaine. Les hélices M2 formant le pore sont colorées en rouge et la boucle M2-M3 est représentée en orange. La flèche bleue indique le chemin emprunté par un ion pour traverser le récepteur. Les cercles roses représentent la position de la poche orthostérique, site de liaison des neurotransmetteurs/agonistes.

Les 5 sous-unités sont assemblées en rosettes formant en leur centre le canal du récepteur. Au sein du domaine extracellulaire, à l'interface entre

sous-unités, se situe la poche orthostérique, site de liaison des neurotransmetteurs, ou autre molécule agoniste. L'organisation en rosette des sous-unités forme, au sein du domaine extracellulaire, le vestibule par lequel les ions accèdent au pore. Le pore, quant à lui, est formé par les hélices M2 de chaque sous-unité. Notons que ces hélices M2 sont reliées au reste du domaine transmembranaire par la boucle M2-M3 qui se situe à l'interface entre les domaines extracellulaire/transmembranaire avec lesquels elle effectue de nombreuses interactions. Le domaine intracellulaire des RCPs est quant à lui extrêmement variable entre les sous-unités, et a pour rôle la localisation des récepteurs à la membrane mais permet également de réguler leur fonction (Figure 2.1).

2.1 Famille

La superfamille des récepteurs-canaux pentamériques comprend plusieurs membres que l'on peut diviser en deux catégories : cationiques ou anioniques, selon que leur canal laisse passer des ions chargés positivement ou négativement, respectivement. Cette séparation évolutive est proposée avoir eu lieu il y a 2 milliards d'années, toutefois les différentes études phylogénétiques publiées s'accordent toutes sur la difficulté d'estimer l'apparition réelle de ces récepteurs (Cockcroft et al.; Jaiteh et al., 2016).

Les RCPs présents chez les vertébrés, regroupés selon leur ligand principal, comprennent les récepteurs nicotiques à l'acétylcholine (nAChR), les récepteurs à la sérotonine de type 3 (5-HT₃), les récepteurs à la glycine (GlyR), les récepteurs au GABA de type A (GABA_A) ainsi que les récepteurs au zinc (ZAC) (Davies et al., 2003). Le récepteur GABA_A étant présent dans différents phylums très éloignés, il pourrait être à l'origine évolutive des autres RCPs anioniques ; il est en de même avec certaines sous-unités du récepteur nicotinique ($\alpha 1$ et $\alpha 7$) pour les RCPs cationiques (Ortells and Lunt, 1995).

La réalisation d'alignements de séquences, renforcés par les récents séquençages de génomes entiers, a permis de recenser de nombreux

homologues des RCPs dans tout le spectre du vivant, à l'exception encore aujourd'hui, des plantes multicellulaires (Dent, 2010; Jaiteh et al., 2016). Il est intéressant de noter que si la superfamille des RCPs compte de nombreux membres, ceux-ci ne partagent parfois que 10% d'homologie de séquence. Par contre, il existe un certain nombre d'acides aminés extrêmement conservés à travers la famille et disséminés le long de la séquence, dont certains sont canoniques, sous-tendant une grande conservation de la topologie de ces récepteurs au cours de l'évolution. C'est l'utilisation de ces motifs comme base d'alignement qui a permis la découverte de nouveaux homologues à travers les phylums (Figure 2.2).

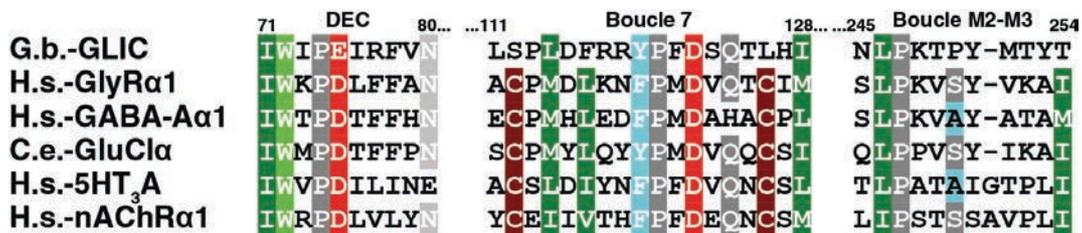


Figure 2.2 : Motifs canoniques de séquence des RCPs. La figure représente un alignement de séquence entre différentes sous-unités de RCPs, ne faisant apparaître que certaines portions de séquences portant des acides aminés particulièrement conservés. La numérotation des acides aminés est celle de GLIC.

Ces analyses ont notamment permis la découverte de RCPs chez les invertébrés, homologues aux récepteurs vertébrés activés par l'acétylcholine, le GABA ou la sérotonine (Dent, 2006) et ont également permis de mettre en avant d'autres ligands des RCPs. On peut particulièrement mentionner les récepteurs activés par le glutamate (GluCl) (Cully et al., 1994), les récepteurs activés par le proton (Beg et al., 2008; Juneja et al., 2014; Mounsey et al., 2007) ainsi que les récepteurs activés par l'histamine (HisCl) (Gisselmann et al., 2002; Zheng et al., 2002) chez les insectes et mollusques (Dent, 2010).

Il est intéressant de noter que le proton a longtemps été uniquement considéré comme modulateur des RCPs vertébrés et non comme agoniste jusqu'à une très récente étude qui a montré que les récepteurs ZAC, activés par le zinc, étaient également activés par les protons

(Trattnig et al., 2016). De même, de nouvelles études indiquent que certaines sous-unités des récepteurs GABA_A et glycine, étant particulièrement sensibles à l'histamine pourraient en fait être des homologues de récepteurs HisCl chez les mammifères (Fleck et al., 2012).

La réalisation d'alignements de séquences basés sur le domaine extracellulaire des RPCs animaux a permis par la suite la découverte de nombreux homologues chez les bactéries et les Archées. Deux récepteurs ont été particulièrement étudiés : le récepteur activé par le proton GLIC (Gloeobacter Ligand-gated Ion Channel) présent chez *Gloeobacter violaceus* et le récepteur ELIC (Erwinia Ligand-gated Ion Channel), activé par la cystéamine et le GABA, présent chez *Erwinia chrysanthemi* (Tasneem et al., 2005).

2.2 Diversité des RCPs

La diversité de la transmission chemo-électrique au sein du cerveau n'est pas uniquement assurée par une diversité chimique (différents neurotransmetteurs et modulateurs) mais également par une combinatoire des multiples sous-unités composant les récepteurs-canaux pentamériques. A ce jour, 46 gènes codant pour des sous-unités différentes des RCPs ont été identifiés chez l'humain (Collingridge et al., 2009) (Table 2.1).

L'identification de la composition en sous-unités et la stœchiométrie d'assemblage au sein de ces récepteurs ont été étudiées par liaison de ligands radioactifs ou fluorescents, expressions en systèmes recombinants, co-immunoprécipitations et études pharmacologiques.

Cationiques		Anioniques	
Nicotinique ACh	$\alpha 1,2,3,4,5,6,7,9,10$	GABA_A	$\alpha 1,2,3,4,5,6$
	$\beta 1,2,3,4$		$\beta 1,2,3$
	γ		$\gamma 1,2,3$
	δ		δ
	ϵ		ϵ
5-HT₃	5-HT ₃ A,B,C,D,E		θ
Zinc activated	ZAC		π
			$\rho 1,2,3$
			$\alpha 1,2,3,4$
			β
		Glycine	

Table 2.1 : Table récapitulative des sous-unités identifiées chez les RCPs mammifères.

Pour les récepteurs nicotiniques on peut séparer les homopentamères, formés des sous-unités $\alpha 7$ ou $\alpha 9$, des hétéropentamères. Chez les hétéropentamères, le site de liaison de l'agoniste situé à l'interface entre sous-unités est partagé entre la composante principale formée de sous-unités α , et la composante complémentaire qui peut-être formée des sous-unités $\alpha 10$, $\beta 2$ ou $\beta 4$, ou bien encore $\alpha 4$. A cela peuvent s'ajouter les sous-unités $\alpha 5$ ou $\beta 3$, ne participant pas dans la liaison à l'agoniste. Les formes les plus courantes présentes dans le cerveau sont $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ (Millar and Gotti, 2009). Le récepteur nicotinique musculaire est quant à lui composé des sous-unités $\alpha 1$ - γ / ϵ - $\alpha 1$ - δ - $\beta 1$ (Résumé dans: Albuquerque et al., 2009; Millar and Gotti, 2009). Il est important néanmoins de noter que l'expression dans des systèmes recombinants de sous-unités nicotiniques a été rapportée en différentes occasions comme permettant la formation de pentamères n'ayant pas de propriétés physiologiques similaires aux récepteurs exprimés dans le système nerveux humain, et donc n'existant peut-être pas (Krashia et al., 2010; Sivilotti et al., 1997).

Les récepteurs à la sérotonine de type 3 ont quant à eux longtemps été supposés homomériques composés uniquement de la sous-unité A (Maricq et al., 1991). Une sous-unité B a plus tard été découverte et a permis la caractérisation d'hétéromères A/B (Davies et al., 1999). Plus

récemment, 3 autres sous-unités (C,D et E) ont été identifiées impliquant l'existence de multiples hétéromères du 5-HT₃ (Jensen et al., 2008; Karnovsky et al., 2003; Niesler et al., 2003).

5 sous-unités sont connues pour le récepteur à la glycine (4 α et une β) dont toutes les sous-unités alpha peuvent s'associer en homopentamères (Hoch et al., 1989). Notons toutefois que le gène α 4 est un pseudo-gène, la sous-unité n'ayant pas un domaine transmembranaire complet. L'homomère le plus répandu est composé de la sous-unité α 2 et est surtout observé au sein de membranes embryonnaires, son expression diminuant largement à la naissance. L'expression majoritaire des récepteurs à la glycine est hétéromère de type α 1 β (3 α :2 β) même si les autres associations sont possibles (Durisic et al., 2012; Griffon et al., 1999; Langosch et al., 1988; Lynch, 2009) ainsi que l'hétéropentamère composé de α 1 et α 2 (Kuhse et al., 1993).

Le récepteur GABA de type A, à l'image du récepteur nicotinique, possède 19 sous-unités différentes permettant une grande combinatoire d'assemblage (Simon et al., 2004). Les sous-unités ρ 1-3 s'assemblent en homopentamères (Shimada et al., 1992; Shingai et al., 1996) et l'expression en système recombinant permet notamment l'obtention de récepteurs homomères β 3, non-existants chez l'humain mais utilisés comme modèle structural de la famille (Miller and Aricescu, 2014). Les récepteurs hétéromères, majoritaires, s'assemblent en comportant 2 α , 2 β et une autre sous-unité (Hevers and Lüddens, 1998).

2.3 Distribution et fonction

Les récepteurs-canaux pentamériques assurent, par leur rôle dans la transmission neuronale excitatrice et inhibitrice, un large répertoire de fonctions et leur distribution au sein du système nerveux central et périphérique est très large.

Les récepteurs nicotiques sont présents dans de nombreuses structures du cerveau ; situés à la membrane post-synaptique de la jonction neuronale, ils répondent à une diffusion rapide et à hautes concentrations (>1mM) d'agoniste, entraînant une ouverture rapide (de la micro à la milliseconde) de leur canal. Les récepteurs nicotiques, notamment $\alpha 7$, sont également présents de façon pré- et péri-synaptique où ils participent à la régulation « tonique » de l'activité nerveuse, ont un rôle dans le métabolisme calcique des neurones et représentent un réservoir de récepteurs pouvant diffuser dans la membrane et remplacer les récepteurs post-synaptiques (Barrantes, 2014). De part ces différences d'activités, ils sont aussi bien impliqués dans les processus de plasticité synaptique (mémoire, attention, apprentissage, récompense etc..) que dans le maintien du métabolisme neuronal (Dani and Bertrand, 2007). Il est intéressant de noter que, outre leur présence dans le système nerveux central et périphérique, les récepteurs nicotiques sont présents dans les intestins, les reins, les poumons et à la membrane de cellules immunitaires (Zdanowski et al., 2015) et épithéliales, entre autres, et sont décrits sous le nom de « système cholinergique non-neuronal » (Beckmann and Lips, 2013).

Les récepteurs 5-HT₃ sont présents dans le système nerveux central, notamment dans les régions responsables du réflexe de vomissement et de la sensation de nausée, et dans le système nerveux périphérique. Ils sont également trouvés pré et post-synaptiquement (Lummis, 2012; Varnäs et al., 2004). Ils sont, comme les récepteurs nicotiques, présents dans le système nerveux entérique et régulent particulièrement certaines fonctions des intestins, notamment la mobilité gastrique (Galligan, 2002).

Les récepteurs inhibiteurs à la glycine sont présents à la membrane post-synaptique mais également pré-synaptique où ils participent à la régulation de la sécrétion du glutamate, de la glycine et du GABA (Lynch, 2009). Leur distribution est large au sein du système nerveux central, cerveau et rétine, et au sein du système nerveux périphérique et notamment dans la colonne vertébrale. Ils participent largement à la

sensation de douleur ou plus généralement au traitement des signaux sensoriels (Betz and Laube, 2006).

Les récepteurs GABA_A sont également largement exprimés au sein des différentes structures du cerveau et de la colonne vertébrale (Monti et al., 2010). Lorsqu'ils sont situés à la membrane post-synaptique, ils sont responsables de la majorité de la neurotransmission inhibitrice au sein du système nerveux central. Les récepteurs extra-synaptiques sont quant à eux responsables de l'inhibition de longue durée (Sigel and Steinmann, 2012a). Ils participent ainsi à la mémoire spatiale et temporelle, et ont un rôle important dans les mécanismes de sédation (Sigel and Steinmann, 2012b). Ils existent également dans le système entérique où, du à une différence de concentration en chlore intracellulaire, ils sont excitateurs (Galligan, 2002; Seifi et al., 2014). De plus, on les trouve également dans le foie, les muscles respiratoires et dans des cellules immunitaires (Alam et al., 2006; Sanders et al., 2015).

2.4 Pathologies et cibles pharmacologiques

Les récepteurs-canaux participant à un grand nombre de processus physiologiques, ils sont impliqués ou suspectés de participer à un large nombre de pathologies, dont des exemples seront présentés dans cette partie. Ces pathologies sont de plus en plus décrites sous le nom de synaptopathies, c'est à dire impliquant une diminution du nombre de synapses ou leur dysfonctionnement, dû par exemple à un problème d'adressage des RCPs à la membrane plasmique, à leur incorrecte agrégation/localisation, ou bien à leur dysfonctionnement allostérique (Dejanovic et al., 2015). Pour se référer plus précisément aux pathologies impliquant une ou plusieurs mutations des récepteurs-canaux, le terme channelopathies peut être préféré (Kullmann, 2010; Steinlein, 2012). Les RCPs sont donc la cible de nombreux composés pharmacologiques dont certains exemples seront décrits dans cette partie. L'importance pharmacologique de ces récepteurs suscite par ailleurs de nombreuses études structurales qui seront développées en détail dans la partie 6.

Les récepteurs nicotiques sont une cible des drogues à usage récréationnel telle que la nicotine. Ils sont ainsi largement étudiés pour leur rôle dans les processus d'addiction et de récompense et sont la cible des agents de sevrage tabagique.

Ces récepteurs sont, en outre, impliqués dans différentes maladies dégénératives : Alzheimer (Lombardo and Maskos, 2015; Shen and Wu, 2015) et Parkinson (Steinlein, 2012). En effet, si les mécanismes précis par lequel ces récepteurs participent à ces pathologies ne sont pas encore élucidés, il a notamment été observé que les individus fumeurs étaient moins susceptibles de développer la maladie de Parkinson impliquant ainsi indirectement les récepteurs nicotiques et le rôle neuro-protecteur de leur modulation par la nicotine (Quik et al., 2015). De plus, le traitement de rongeurs par des molécules ciblant la sous-unité $\alpha 6$ (exprimée dans les régions du cerveau touchées par la pathologie), par exemple, permet de compenser jusqu'à 50% de perte neuronale, indiquant plus directement un rôle important des récepteurs nicotiques (McCallum et al., 2005).

Les nAChRs sont également suspectés de participer dans les syndromes autistiques (Chilian et al., 2013; Wang et al., 2015) ou des troubles psychiatriques tels que la schizophrénie et plus particulièrement à travers le développement d'une auto-immunité contre la sous-unité $\alpha 7$ (Chandley et al., 2009; Wallace and Bertrand, 2015). Il a également été avancé que l'usage de drogues récréationnelles chez certains patients atteint de troubles du comportement serve d'automédication.

Le développement d'une auto-immunité contre les récepteurs nicotiques, à la jonction neuromusculaire, entraîne également la pathologie *myasthenia gravis* caractérisée par une faiblesse musculaire pouvant s'étendre à l'ensemble du corps (Gilhus and Verschuuren, 2015). Enfin, des mutations ponctuelles des récepteurs nicotiques sont également impliquées dans l'épilepsie nocturne du lobe frontal (Steinlein, 2004).

Le traitement, positif, de patients présentant des syndromes aussi divers que l'anxiété, les troubles de l'alimentation ou encore la schizophrénie, par des antagonistes des récepteurs 5-HT₃ indique que cette sous-famille des

RCPs participe à ces pathologies, bien que leur rôle précis ne soit pas encore élucidé. De plus, des polymorphismes des sous-unités A et B des récepteurs ont pu être liés à l'apparition de syndromes bipolaires et à la dépression (Niesler, 2011). Enfin, une délétion dans le promoteur du gène codant pour la sous-unité B a été identifiée chez des patients présentant des sensations de nausées accrues, et des polymorphismes des sous-unités A, E et C ont été impliqués dans le syndrome du colon irritable (Niesler, 2011).

Les récepteurs 5-HT₃ sont donc la cible d'une large classe de molécules regroupées sous le terme de « setrons » ; ce sont généralement des antagonistes des récepteurs utilisés pour leurs propriétés antiémétiques, et pour le traitement des troubles gastro-entériques plus généralement. Les études physiopathologiques des récepteurs 5-HT₃ sont encore préliminaires, mais ils sont par ailleurs suspectés de participer dans diverses addictions, à l'alcool, l'héroïne ou encore la cocaïne et la morphine (Lummis, 2012; Walstab et al., 2010).

Les récepteurs anioniques GABA_A sont également impliqués dans les troubles de la personnalité tel que l'autisme et la schizophrénie, et ont un rôle dans certaines des perturbations liées à la trisomie 21 (Rudolph and Möhler, 2014). Cette récurrence des pathologies impliquant différents types de RCPs souligne par ailleurs les difficultés actuelles dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués.

Mais les récepteurs GABA_A sont surtout étudiés pour leur rôle fort dans les épilepsies, résultant de multiples mutations au sein de différentes sous-unités. Ces mutations ont des conséquences multiples selon leur localisation dans la sous-unité ou encore la sous-unité affectée, mais entraînent notamment une baisse du taux d'expression des récepteurs, leur agrégation au sein des neurones, l'impossibilité de former des pentamères ou simplement perturbent le fonctionnement allostérique des récepteurs (Macdonald et al., 2010).

De part leur rôle dans la modulation inhibitrice du système nerveux, les récepteurs GABA_A sont la cible majeure des anesthésiques généraux qui potentialisent leurs courants. Ils sont également la cible des

benzodiazépines, largement prescrites à travers le monde pour leurs effets anxiolytiques, lorsqu'elles ciblent les sous-unités $\alpha 2/\alpha 3$, mais qui ont également un effet sédatif lorsqu'elles ciblent la sous-unité $\alpha 1$ (Braat and Kooy, 2015).

Il est intéressant de noter que les récepteurs $GABA_A$ sont également modulés par les neurostéroïdes, synthétisés naturellement par les cellules neuronales à partir notamment de l'hormone sexuelle progestérone ou encore de l'hormone de réponse au stress deoxycorticostérone. Ces dernières ont un rôle potentialisateur, mais certains neurostéroïdes ont également un rôle inhibiteur sur les récepteurs (Seljeset et al., 2015).

Quant aux récepteurs glycine, leurs mutations, majoritairement au sein de la sous-unité $\alpha 1$ mais également, plus rarement, au sein de la sous-unité β , entraînent la pathologie dénommée hyperekplexia, ou, syndrome des muscles rigides (Bode and Lynch, 2014). Les récepteurs à la glycine étant inhibiteurs, leur dysfonctionnement entraîne une activité musculaire exacerbée en réponse à des stimuli. Les mutations des GlyRs entraînent, comme c'est le cas pour les $GABA_A$ R, une diminution de l'expression à la membrane ou encore un fonctionnement allostérique perturbé. De façon surprenante, certaines de ces mutations entraînent une activité spontanée des récepteurs, à priori incompatible avec la pathologie, mais il a été proposé que l'ouverture répétée de ces canaux modifie les conditions ioniques intracellulaires, permettant une génération facilitée de potentiels d'actions, expliquant ainsi la surexcitabilité des fibres musculaires (Bode et al., 2013; Chung et al., 2010).

Cependant, beaucoup de patients atteints par l'hyperekplexia ne portent pas de mutations des GlyRs ; en effet, les perturbations du contrôle de la contraction musculaire sont également causées par un mauvais adressage ou maintien des GlyRs à la membrane (Rees et al., 2003). Notons également que les deux sous-classes de récepteurs inhibiteurs ont une pharmacologie commune ; en effet, les récepteurs à la glycine, comme les récepteurs $GABA_A$, sont potentialisés par les anesthésiques généraux et les alcools (Mascia et al., 1996; Nakahiro et al., 1996). A l'inverse, les alcools inhibent la fonction des nAChRs, bien qu'il ait été

rapporté qu'ils puissent être potentialisateurs à faibles concentrations, expliquant leur effet physiologique général similaire à l'anesthésie (Bradley et al., 1984).

3. Fonctionnement des récepteurs-canaux

3.1 Caractérisations électrophysiologiques

La fonction des RCPs impliquant l'ouverture de leur canal et par là, la diffusion passive d'ions à travers la membrane, leurs caractérisations fonctionnelles se font par les techniques d'électrophysiologie permettant d'enregistrer les courants ioniques correspondant au flux d'ions à travers la membrane. Il existe deux grands types de configurations permettant ces études : en cellule entière, ou sur un morceau de membrane (patch).

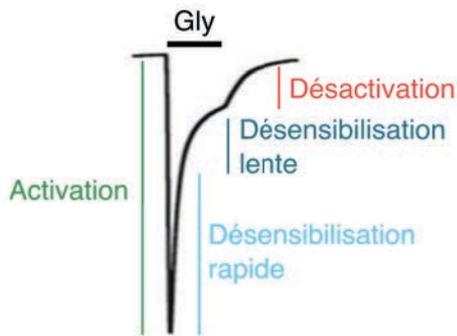
La configuration cellule entière permet l'enregistrement d'une population de récepteurs et de mesurer le peuplement de différents états conformationnels au sein de cette population. En effet, les RCPs existent en trois états majoritaires:

1. L'état basal, ou état de repos. Cet état présente un canal fermé, est activable et est majoritairement stabilisé en absence d'agoniste.
2. L'état actif. Cet état présente un canal ouvert permettant le passage des ions à la membrane et est stabilisé en présence d'agoniste. Notons que c'est le seul état qui peut être observé directement par les techniques d'électrophysiologie.
3. L'état désensibilisé. Cet état présente un canal fermé et est stabilisé en présence prolongée d'agoniste. Cet état étant réfractaire à l'activation, il est structurellement différent de l'état de repos.

Si l'on prend l'exemple du récepteur glycine, on peut observer figure 3.1 qu'avant l'application d'agoniste il n'y a pas de courants enregistrés à la membrane, les récepteurs sont majoritairement à l'état de repos. Suite à une application de glycine, on observe un pic de courant entrant (conventionnellement représenté vers le bas), signifiant une entrée d'ions et donc la stabilisation de l'état actif, suivi rapidement par une décroissance de ce courant. On notera d'ailleurs que dans le cas présenté ici, la décroissance du courant se fait suivant deux cinétiques différentes

pointant vers l'existence de deux états désensibilisés différents, lent et rapide. Lorsque la cellule n'est plus perfusée par l'agoniste, les canaux se referment, c'est la désactivation.

Enregistrement d'une population



Enregistrement d'un canal unique

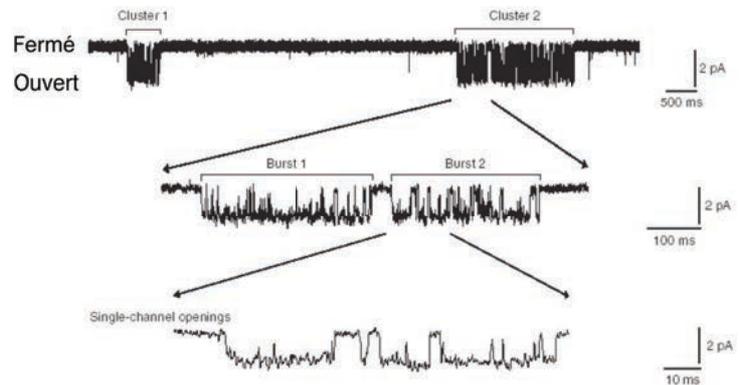


Figure 3.1 : Courant caractéristique des récepteurs glycine et GABA_A. Gauche : Courant entrant enregistré sur des récepteurs glycine exprimés à la membrane d'un ovocyte de Xénope (enregistrement d'une population de récepteurs), suite à une application de glycine. Sur la trace sont indiquées les différentes périodes auxquelles le texte fait référence. Droite : Enregistrement d'un récepteur GABA_A unique obtenu par patch-clamp en présence d'une solution de 1mM GABA. La trace montre divers évènements d'ouverture et de fermeture de ce canal unique (Mortensen and Smart, 2007).

En complément de ces études de population, la caractérisation des RCPs est possible par des enregistrements de « patch-clamp ». Dans ce cas, une pipette scellée à la membrane cellulaire permet d'exciser un « patch » (morceau de membrane) de surface assez petite pour qu'elle ne porte qu'un seul récepteur-canal. Cette technique permet donc d'enregistrer la fonction d'une molécule unique (Figure 3.1).

L'accès aux cinétiques d'activation et de désensibilisation des récepteurs-canaux ont tout d'abord été extraites de données fonctionnelles sur des ensembles de molécules. Par la suite, le développement des techniques de patch-clamp, notamment sur des enregistrements de canaux uniques, ont permis d'atteindre des résolutions temporelles inédites et ainsi la détermination des temps d'activation et de désactivation des récepteurs (Figure 3.1). Chaque famille de RCPs possède des caractéristiques

fonctionnelles et cinétiques qui leur sont propres, notamment concernant le nombre d'états désensibilisés visités. Malgré ces différences, les cinétiques d'entrée dans ces différents états sont du même ordre de grandeur pour toute la famille : de l'ordre de la dizaine à centaine de microsecondes pour l'ouverture, de la centaine de millisecondes pour la désensibilisation rapide, et de l'ordre de quelques secondes pour la désensibilisation lente (Breitinger, 2001). Si les systèmes d'enregistrements en canaux uniques sont de plus en plus performants, il est probable que des événements d'ouverture ou fermeture restent indétectés, dû à la limite de la résolution temporelle, entraînant une sous-estimation des cinétiques calculées (Chakrapani and Auerbach, 2005).

3.2 Modèles thermodynamiques

3.2.1 Modèle MWC

Le développement, il y a plus d'un siècle, des techniques de cristallographie a permis la résolution de la structure de différentes enzymes, mais également de l'hémoglobine, et a montré qu'il existe différents sites au sein de ces protéines : le/les sites de liaison de la molécule efférente, et le site actif, ces sites pouvant être distants de plusieurs dizaines d'angström. Ces observations amènent à l'utilisation généralisée du terme allostérique pour décrire des systèmes dont la liaison d'une molécule sur un site (le site de liaison) est corrélé à des changements structuraux en un deuxième site (le site actif), topologiquement distant du premier.

En 1965 Monod, Wyman et Changeux proposent un modèle pour expliquer le fonctionnement allostérique d'enzymes qui ne peuvent pas être expliqués dans les termes classiques d'enzymologie (Monod et al., 1965).

Leur modèle est basé sur cinq postulats définissant les caractéristiques des protéines allostériques et de leurs transitions d'un état à un autre.

- Les protéines allostériques sont des oligomères ayant au moins un axe de symétrie.
- Il existe au moins deux états distincts dans lesquels l'oligomère existe et la stabilisation de chacun de ces états est réversible. L'énergie d'interaction, ou les interactions elles-mêmes, entre chaque monomère diffèrent selon l'état de l'oligomère.
- Chaque monomère comporte un site -identique- de liaison au ligand. Ces sites sont donc organisés selon le même axe de symétrie que l'oligomère.
- La conformation de chaque monomère est influencée par son association avec les autres monomères. Ainsi, dans tous les états visités par l'oligomère, sa symétrie est conservée.
- L'affinité d'un ligand pour la protéine varie en fonction de son état.

La mise en équation de leur modèle permet de décrire que : pour une protéine à l'équilibre entre deux états A et B, en absence de ligands, la population d'un état sera dépendante de la constante d'isomérisation L de la protéine, constante qui lui est propre. En présence d'un ligand, la population d'un état sera dépendante de cette constante L et des constantes d'affinités X_A et X_B de ce ligand pour chaque état, le ligand stabilisant l'état pour lequel il a la plus haute affinité (Figure 3.2). Ainsi, le changement conformationnel n'est pas induit par le ligand, ce dernier n'a qu'un rôle stabilisateur d'un équilibre préexistant (Figure 3.3).

De plus, la forme sigmoïde des courbes de dose-réponse observées dans la mesure de l'activité de nombreuses enzymes, et différente des relations hyperbolique du formalisme enzymatique classique, est expliquée par la coopérativité de liaison des molécules efférentes, coopérativité qui est possible si la protéine maintient une symétrie structurale dans chacun de ces états.

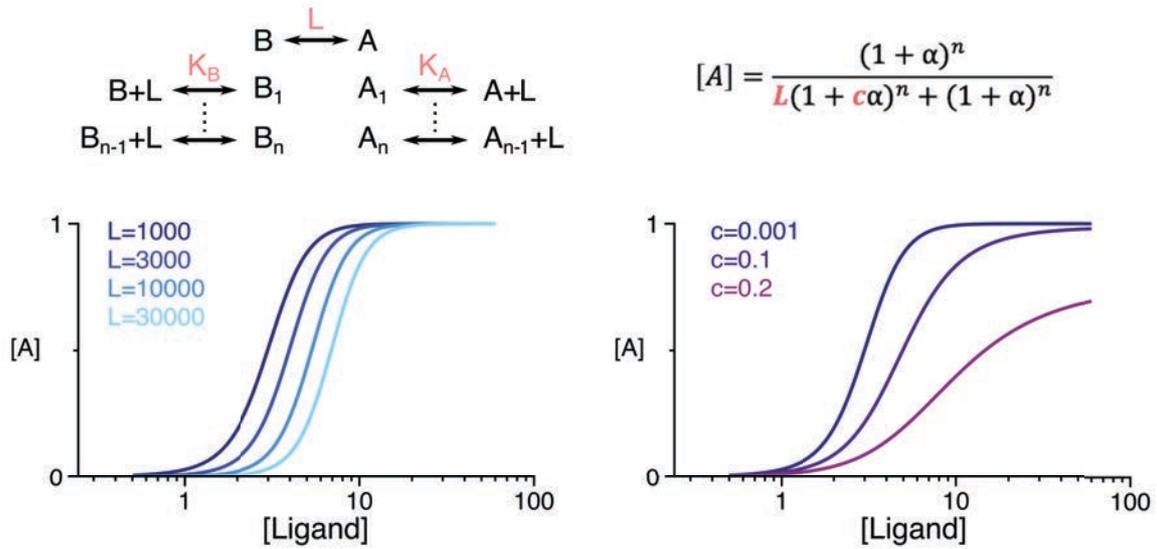


Figure 3.2 : Relation dose-réponse de protéines allostériques. Les courbes théoriques des deux graphiques représentent l'apparition de l'état A en fonction de la concentration d'agoniste selon l'équation décrite, et selon que l'on fasse varier la constante d'isomérisation L ou l'affinité du ligand pour l'état A représenté par le rapport $c = K_A/K_B$. Le terme α représente quant à lui la concentration de ligand divisée par sa constante de dissociation du récepteur. Ainsi on peut voir que plus la constante d'isomérisation est petite, moins il faut de ligand pour stabiliser l'état A. De même, plus l'affinité pour l'état A est grande ($K_A \ll K_B$), plus la stabilisation de l'état A se fera à basse concentration de ligand. Dans la cas inverse où $K_A \sim K_B$, les récepteurs ne peuplent « jamais » à 100% l'état A. Sauf indication contraire les valeurs suivantes ont été utilisées : $L=1000$, $n=5$, $c=0,001$.

3.2.2 Modèle KNF

Les travaux de Koshland, Némethy et Filmer, publiés un an après le modèle MWC, s'attachent à développer différents modèles de transitions de protéines tétramériques et à les confronter aux données expérimentales existantes, notamment sur l'hémoglobine (Koshland et al., 1966). Les modèles testés diffèrent notamment dans le nombre d'interactions que les monomères effectuent entre eux.

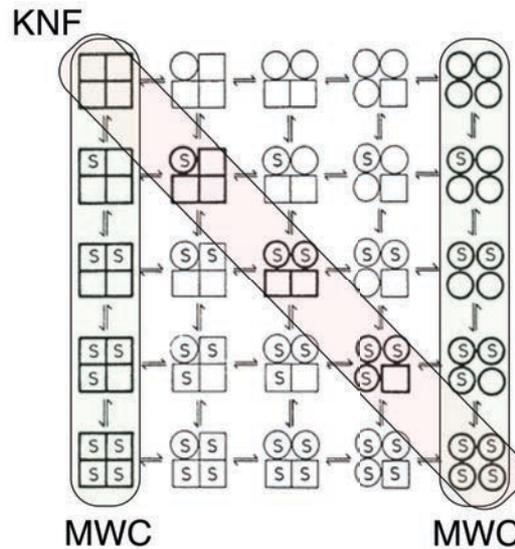


Figure 3.3 : Modèles KNF et MWC. Représentation schématique des transitions comportant tous les états dans lesquels une protéine tétramérique peut exister, selon les deux modèles. Les conformations prévues par le modèle KNF sont encadrées en rose et celles prévues par le modèle MWC en vert. Les carrés représentent une sous-unité en conformation basale/fermée et les ronds une sous-unité en conformation active. Le S représente le substrat, ou ligand/agoniste. (Eigen 1967).

Le point sur lequel le modèle KNF diffère le plus du modèle MWC est que la liaison d'un ligand sur une sous-unité est requise pour que cette sous-unité change de conformation (Figure 3.3). Le modèle KNF n'implique pas de coopérativité de liaison des effecteurs, ni de symétrie de conformation de la protéine, c'est la liaison d'un effecteur qui induit le changement conformationnel.

3.2.3 Les RCPs, des protéines allostériques

Dans une étude sur les récepteurs nicotiques à la jonction neuromusculaire de grenouille, Katz et Thesleff s'intéressent aux propriétés de désensibilisation des récepteurs, c'est à dire à l'entrée dans un état « non-actif » en présence d'agoniste. Ils proposent un modèle d'équilibre thermodynamique où les récepteurs peuplent deux états A et B, différents de l'état de repos (état non actif en absence d'agoniste), et où la présence d'agoniste sélectionne un état par rapport à un autre. Pour

expliquer leurs données, ils proposent également que les récepteurs existent à l'état désensibilisé en absence d'agoniste, un postulat qui est repris dans le modèle allostérique MWC mais est en contradiction avec le modèle KNF (Katz and Thesleff, 1957) (Figure 3.4 A).

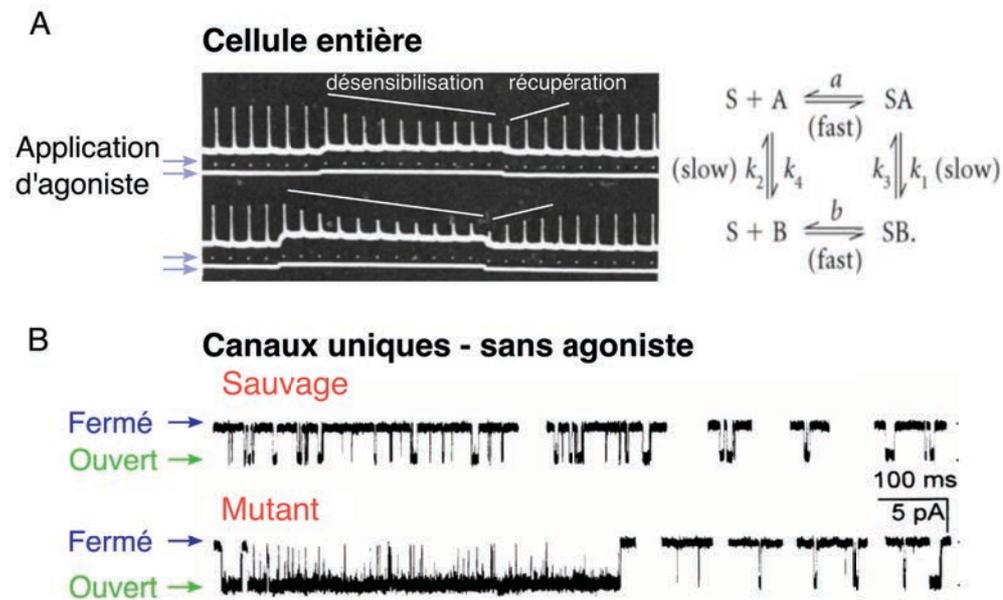


Figure 3.4 : Courants caractéristiques du nAChR. A : Le tracé représente les courants enregistrés à la jonction neuromusculaire de grenouille. La figure est complétée par un modèle de population des états A (ouverts/actifs) et B (fermés/désensibilisés). Les cellules sont perfusées avec deux solutions d'ACh, la première est appliquée en continue (ligne blanche continue), la seconde est appliquée ponctuellement (pointillés blancs). Ces traces permettent ainsi d'observer deux populations de récepteurs 1) les récepteurs ouverts par la perfusion continue (trace continue) 2) les récepteurs ouverts par l'application ponctuelle d'ACh (pics). On peut ainsi observer qu'en présence continue d'ACh la population de récepteurs « ponctuels » diminue avec le temps, ils désensibilisent. On remarque également qu'en absence de perfusion continue, il y a un temps de récupération nécessaire pour de nouveau observer la population entière de récepteurs « ponctuels », ainsi, en absence d'agoniste ces récepteurs existent encore à l'état désensibilisé. B : Les traces représentent les ouvertures d'un récepteur unique nACh en absence d'agoniste. Figure créée à partir de (Katz and Thesleff, 1957; Labarca et al., 1995).

Dans cette étude, les auteurs mettent également en avant une observation : la relation « dose-effet » n'est pas hyperbolique comme le prévoient les formalismes enzymatiques classiques, mais a une forme

sigmoïde et en tirent la conclusion que les récepteurs portent plusieurs sites de liaison de l'ACh et que l'efficacité d'une molécule augmente avec le nombre de molécules liées, en d'autres termes la liaison d'agoniste sur les récepteurs nicotiques est coopérative.

De plus, des mesures en canaux uniques, c'est à dire qui permettent d'enregistrer les évènements d'ouvertures d'un seul récepteur, ont mis en évidence la propriété des récepteurs-canaux à s'ouvrir même en absence de ligands (Jackson, 1984). Enfin, la mutation d'acides aminés dans le pore des récepteurs, et ce chez différents membres de la famille, entraînent de multiples ouvertures spontanées des récepteurs en absence d'agoniste (Figure 3.4 B) (Bertrand et al., 1997; Chang and Weiss, 1999; Labarca et al., 1995).

Ainsi, ces observations, depuis répétées et confirmées sur différents membres de la famille, sont en accord avec les postulats proposés par la théorie MWC, au contraire de la théorie KNF qui ne prévoit, notamment, pas les ouvertures spontanées de canaux.

Il est aujourd'hui largement accepté que le fonctionnement des RCPs est correctement décrit par un modèle allostérique de type MWC bien que le postulat de symétrie soit dans certains cas, notamment pour les hétéromères, remis en question. Il en est de même pour le postulat initial statuant que les transitions allostériques s'effectuent principalement par des réorganisations quaternaires, et il est admis que des réorganisations tertiaires peuvent avoir lieu, notamment au site de liaison de l'agoniste et des différentes molécules effectrices.

3.3 Modèles cinétiques d'activation

Historiquement, ce sont Del Castillo et Katz qui proposent la première équation permettant de décrire les étapes impliquées dans les transitions entre états des RCPs, en termes cinétiques et non thermodynamique. Le premier modèle comprend d'abord deux états (fermé et ouvert) (Del Castillo and Katz, 1957) puis est rapidement complété d'un troisième état

désensibilisé (Katz and Thesleff, 1957). Le modèle prévoit l'existence d'un état ligandé-fermé et d'un état ligandé-ouvert.

En effet, l'analyse de données électrophysiologiques obtenues par enregistrements en canal-unique, en présence d'agoniste, montre des périodes de « burst » représentant l'activation des canaux, entrecoupée de périodes silencieuses représentant la désensibilisation des canaux. Au sein des périodes de « burst », il existe des périodes de silence qui représentent l'isomérisation de l'état ligandé-ouvert vers l'état ligandé-fermé (Figure 3.5).

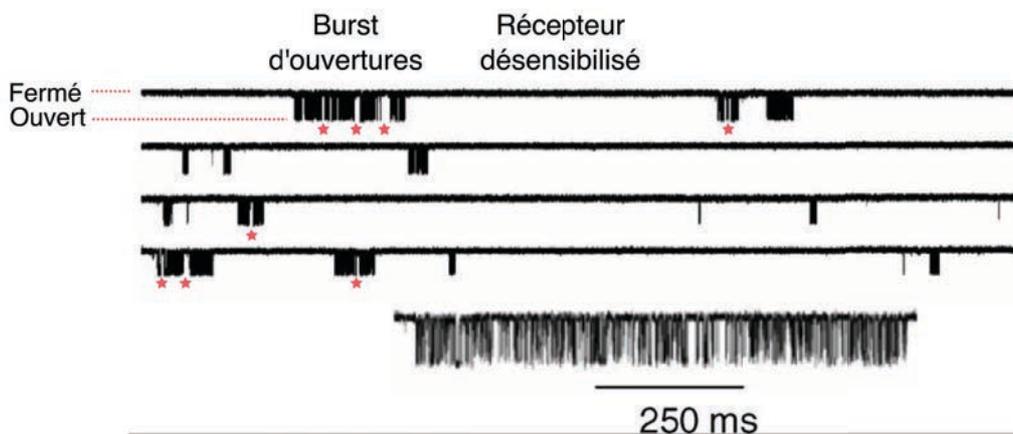


Figure 3.5 : Enregistrement en canal-unique d'un récepteur nACh. La trace montre les courants enregistrés pour un récepteur unique à la membrane, les ouvertures sont regroupées en « burst » comprenant de multiples événements d'ouverture et de fermeture. Les longues périodes sans ouverture correspondent à des séjours du récepteur dans l'état désensibilisé. Les étoiles ont été ajoutées pour identifier certaines périodes de fermeture intra-burst (correspondant à l'état ligandé-fermé), ces fermetures sont particulièrement visibles sur le zoom de la trace. Tiré de (Auerbach, 2012).

Ces données ne pouvant être seulement interprétées par la présence d'un état mono-ligandé, le modèle original est complété par l'existence d'un état di-ligandé (Figure 3.6). Le développement de ce modèle a ainsi permis d'expliquer l'activation des récepteurs nicotiques par l'existence d'états non- mono- et di-ligandés pouvant chacun s'isomériser vers leur état actif respectif. Ainsi, les molécules agonistes se lient avec une faible affinité aux récepteurs fermés, et ont pour effet, non pas d'entraîner directement l'ouverture du canal, mais d'augmenter les constantes

d'isomérisation vers l'état activé. L'agoniste ayant une forte affinité pour l'état activé, il stabilise cette conformation (Auerbach, 2010; Purohit and Auerbach, 2009).

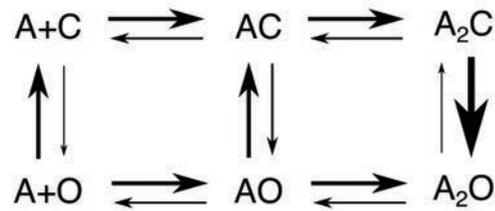


Figure 3.6 : Schéma d'activation pour un récepteur portant deux sites agoniste. L'épaisseur des flèches rend compte des constantes de temps des transitions détaillées (petite flèche : lente, grande flèche : rapide). A : agoniste/ligand, C : état fermé, O : état ouvert.

Néanmoins, ces modèles sont régulièrement revisités et raffinés afin de mieux rendre compte des données fonctionnelles obtenues sur les RCPs (Burzomato et al., 2004; Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009; Sine and Steinbach, 1986).

3.3.1 Le modèle FLIP

Les données obtenues sur le récepteur glycine mesurant les temps de séjours dans les états silencieux à l'intérieur des bursts, c'est à dire les états fermés non-désensibilisés, ne pouvaient pas être uniquement expliquées par l'existence d'états ligandés-fermés de basse affinité pour l'agoniste. Les données suggéraient l'existence d'autres états fermés, de haute affinité.

Les auteurs de cette étude proposent un modèle en deux étapes dans lequel le récepteur ligandé, ou non, s'isomérisé en une conformation de haute affinité mais toujours fermée, qui s'isomérisé ensuite en une conformation ligandée ouverte. Ils dénomment cette conformation intermédiaire FLIP (Figure 3.7) (Burzomato et al., 2004).

Les auteurs poursuivent leurs travaux en confrontant leur modèle original à l'effet différentiel de certaines molécules : les agonistes et les agonistes partiels. Les agonistes partiels sont capables de promouvoir l'activation

des récepteurs mais avec une probabilité plus faible que les agonistes « complets ». Ils concluent que les différents agonistes ont un impact identique sur la transition de FLIP vers actif, qui est largement favorable une fois que les récepteurs sont dans l'état FLIP. Leurs effets diffèrent dans leur capacité à promouvoir la stabilisation de l'état FLIP (Lape et al., 2008).

Ils décrivent ainsi un état intermédiaire structural obligatoire, de court temps de vie.

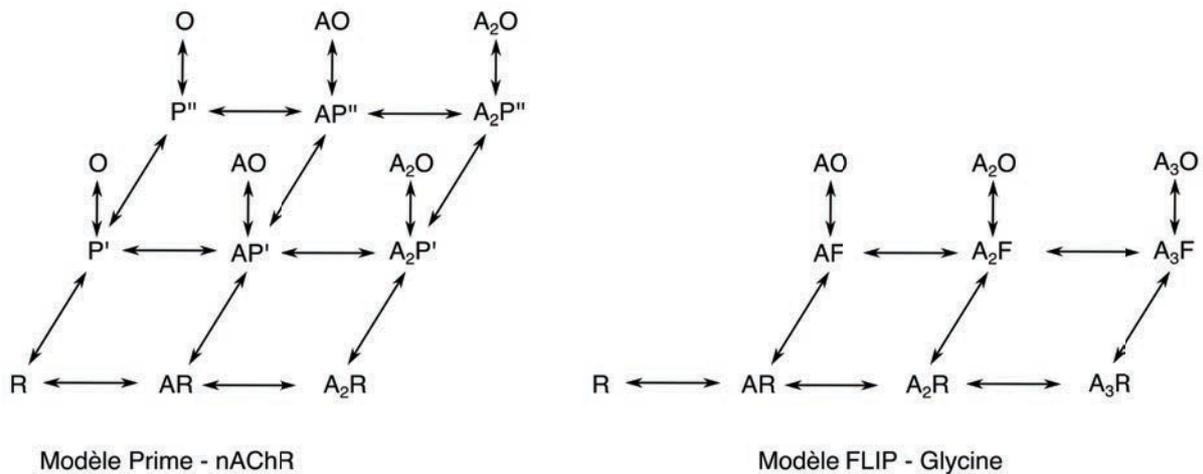


Figure 3.7 : Modèles Prime et FLIP. Le modèle Prime a été développé à partir de travaux sur le nAChR hétéromère, un récepteur qui ne possède que deux sites de liaison d'agoniste. Le modèle FLIP a été développé sur le récepteur Glycine qui porte trois sites de liaison de l'agoniste. R : état de repos – fermé, A : molécule d'agoniste, O : état actif – ouvert, P' '' : états primes, F : état FLIP.

3.3.2 Le modèle PRIME

Dans la description de ce modèle, les auteurs étudient également les temps de séjours dans les états ouverts et fermés, mais cette fois sur le récepteur nicotinique. Dans les enregistrements en canal unique, ils observent des périodes de burst et des périodes silencieuses de durées différentes et concluent que le récepteur existe en 5 états différents (Mukhtasimova et al., 2009).

Pour rendre compte de l'existence de ces états, les auteurs proposent l'existence de deux conformations appelées primed :

La première est décrite avec un site occupé par un ligand, dont le temps de vie est de durée intermédiaire et qui précède des ouvertures de courtes durées.

La deuxième possède deux sites occupés (donc pour le nAChR hétéromérique, la totalité des sites), a un temps de vie court et précède des ouvertures de longues durées.

Ils notent de façon très intéressante que la cinétique d'entrée dans ces états intermédiaires primed est indépendante de la présence d'agoniste se différenciant ainsi du modèle FLIP.

3.3.3 Rate Equilibrium Free-Energy Relationship (REFER)

L'application du principe de REFER (Rate Equilibrium Free-Energy Relationship) à l'étude des récepteurs canaux permet d'étudier les événements structuraux participant à la transition entre deux états « finaux », l'état de repos et l'état actif, et les classer en termes séquentiels (Grosman et al., 2000; Leffler, 1953).

Le REFER se base sur deux postulats. 1) Les différents états du récepteur (repos, actif et de transition) sont en équilibre permanent. Le principe du REFER étant de perturber cet équilibre et mesurer les différences d'énergies libres suite à cette perturbation. 2) La variation d'énergie libre de l'état de transition a une relation linéaire avec les variations d'énergies libres des états finaux selon un paramètre noté ϕ . Le paramètre ϕ rend compte de la « position » de l'état de transition sur le chemin entre les deux états finaux (à l'état R $\phi=0$, à l'état A $\phi=1$). Ainsi, en perturbant le système par l'insertion de mutations ponctuelles et en calculant le paramètre ϕ pour chacune de ces positions, il est possible de générer une carte de l'état d'avancement, dans la transition R vers A, de chaque résidu.

Les travaux d'Auerbach et ses collaborateurs ont largement utilisé le REFER afin d'éclaircir les mécanismes structuraux impliqués dans les transitions du récepteur nicotinique. De ces études ils concluent les points suivants :

- Les mutations hors du site de liaison de l'agoniste n'ont peu ou pas d'effet sur l'affinité de l'agoniste, impliquant que cette affinité est largement dépendante uniquement de réorganisations locales au sein du site.
- La plupart des positions testées ont un effet indépendant sur la transition. Ainsi il est peu probable que la transition s'effectue telle une réaction en chaîne mais plutôt que les résidus se réorganisent localement indépendamment les uns des autres. Ils observent néanmoins que les résidus avec des ϕ similaires sont souvent regroupés au sein de même régions.

De multiples études, ciblant différentes régions et incorporant plusieurs centaines de mutations, ont permis d'établir des modèles de la transition de l'état de repos vers l'état actif, selon la région ciblée (Pour rappel de la structure d'un RCP, voir figure 2.1) (Chakrapani et al., 2004; Cymes et al., 2002; Grosman et al., 2000; Purohit et al., 2007). Une étude récente utilisant le REFER à l'échelle du récepteur entier montre que le milieu du domaine extracellulaire, notamment dans la proximité de la poche orthostérique, bouge très tôt au cours de la transition, et qu'il en est de même pour certains résidus de la boucle M2-M3 et de l'hélice M2 ($\phi \sim 0,95$). Ces résultats obtenus sur deux régions éloignées de plusieurs dizaines d'Å confirment que la transition ne s'effectue pas par une cascade de réorganisations partant du haut du récepteur (poche orthostérique) au bas du récepteur (pore). Ils identifient d'autres clusters, ou régions, avec des ϕ de différentes valeurs et proposent ainsi le modèle suivant :

Lors de l'isomérisation de l'état de repos à l'état actif, la région de mi- ainsi que la boucle M2-M3 effectuent la transition en premier, suivis du reste de l'ECD et de l'interface entre ECD et TMD. S'ensuivent un mouvement du cœur du TMD et donc des hélices M2 formant le pore, puis des réarrangements à la périphérie du TMD (Purohit et al., 2013).

Dans une autre étude, utilisant le principe du REFER (mesure des temps de séjours dans les états ouverts et fermés permettant de déduire les constantes temporelles d'ouverture et de fermeture du récepteur), des mutations ont été réalisées sur le nAChR dans le but d'accélérer les transitions d'ouverture du récepteur. Les auteurs observent que ces constantes peuvent être accélérées jusqu'à un plateau. Ils proposent ainsi qu'il existe une limite cinétique à l'activation d'un récepteur et estiment cette limite à $0,86\mu\text{s}^{-1}$. On peut envisager que cette valeur, dépendante de la taille de la protéine et des interactions effectuées par les acides aminés la composant, puisse être différente selon le type de récepteur étudié, néanmoins ce travail permet d'établir un ordre de grandeur du temps nécessaire aux réorganisations structurales des RCPs pour passer d'un état à un autre (Chakrapani and Auerbach, 2005).

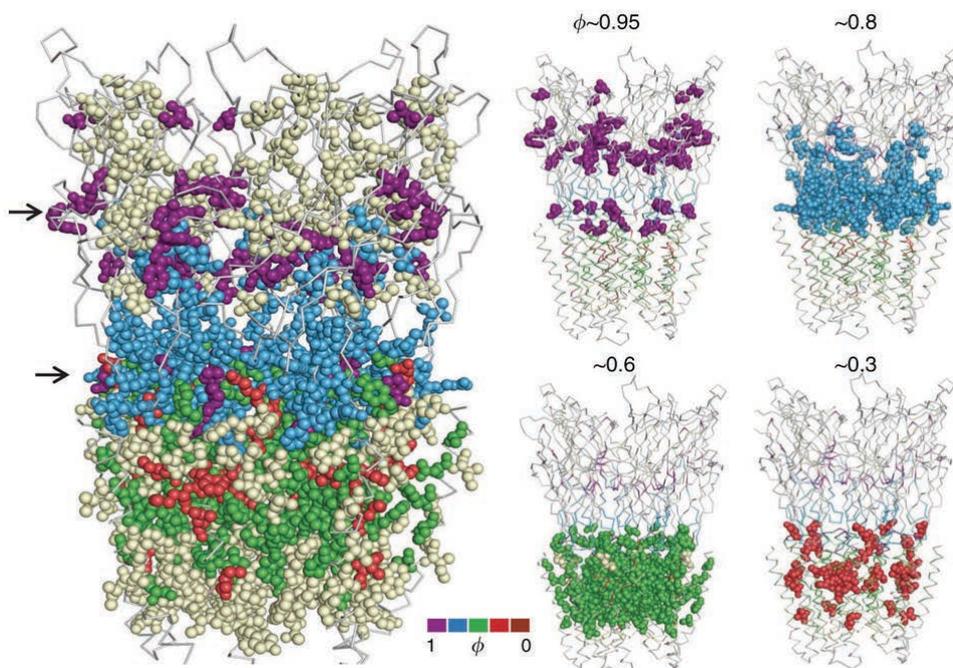


Figure 3.8 : Transition repos-actif du récepteur nACh. Les données obtenues sur le récepteur nACh ont été cartographiées sur la structure de GLIC. Les acides aminés étudiés par REFER sont colorés selon leur valeur de ϕ . Les flèches sur la structure principale indiquent les deux régions bougeant en premier dans la transition structurale de repos vers actif. Figure tirée de (Purohit et al., 2013).

4. Etude du récepteur-canal bactérien, GLIC

4.1 Caractérisation fonctionnelle de GLIC

4.1.1 Activation

Le récepteur-canal bactérien GLIC est un récepteur cationique activé par les protons (Figure 4.1) avec un $pH_{50}=5,3$ (valeur pour laquelle la moitié de l'activation maximale est observée). Il est intéressant de noter que, si beaucoup de récepteurs-canaux eucaryotes sont modulés par le proton, seuls deux autres récepteurs au sein de la famille ont le proton comme agoniste, un récepteur identifié chez *C.Elegans*, très peu étudié (Beg et al., 2008), et GLIC, ce dernier étant le plus caractérisé (Bocquet et al., 2007). Cependant, une récente étude des récepteurs activés par le zinc montre que ceux-ci sont également activés par le proton, renforçant l'intérêt de l'étude de GLIC comme récepteur modèle de la famille (Trattnig et al., 2016).

Le récepteur GLIC n'est ainsi pas activé par un ligand « conventionnel » se liant au sein de la poche orthostérique. Si le ou les sites de liaison du proton n'ont pas encore été caractérisés, différentes études suggèrent que ces sites se situent au sein du domaine extracellulaire (Duret et al., 2011; Gonzalez-Gutierrez et al., 2013), sans pour autant éliminer la possibilité d'un site au sein du TMD (Wang et al., 2012).

GLIC est un récepteur canal cationique, identiquement perméable aux ions K^+ , Na^+ . Sa fonction est caractérisée par des cinétiques d'activation relativement lentes, en comparaison aux membres eucaryotes de la famille, avec un τ d'activation allant de la dizaine à la centaine de millisecondes (Bocquet et al., 2007; Laha et al., 2013).

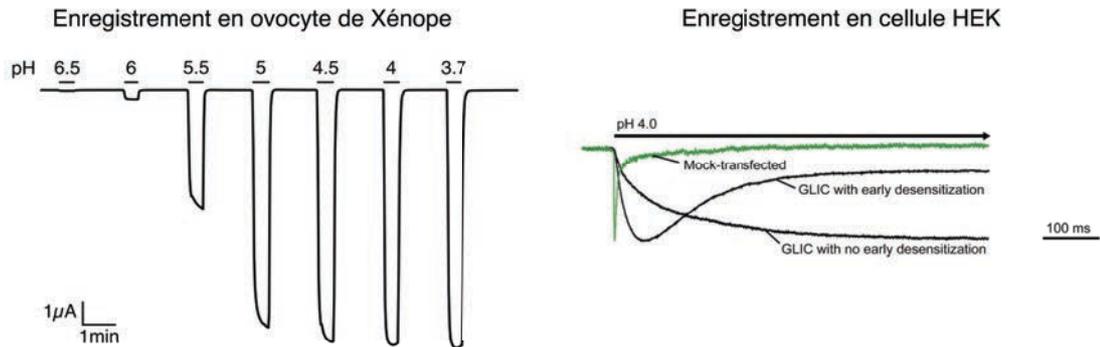


Figure 4.1 : Caractérisation fonctionnelle de GLIC. A gauche, un enregistrement en voltage-clamp de GLIC exprimé en ovocyte de Xénope, à droite GLIC exprimé en HEK et mesuré sur un patch en configuration outside-out (Laha et al., 2013).

4.1.2 Désensibilisation

Dans une étude sur GLIC exprimé en cellules HEK, Laha *et al.* décrivent qu'approximativement une cellule testée sur deux montre une décroissance de courant bi-phasique, en présence prolongée d'agoniste, et que l'autre moitié des cellules testées ne présentent qu'une décroissance du courant lente (Figure 4.1). Ils estiment ainsi que GLIC désensibilise avec une constante cinétique de $T_{\text{désensibilisation}}=10\text{s}$. A l'inverse, les études de deux autres équipes, sur GLIC exprimé en cellules HEK et reconstitué en liposomes, montrent un phénotype de désensibilisation rapide des récepteurs avec un $T_{\text{désensibilisation}}= 1,4\text{s}$ et $1,6\text{s}$, respectivement (Gonzalez-Gutierrez and Grosman, 2010; Velisetty and Chakrapani, 2012a). De façon intéressante, Gonzalez-Gutierrez et Grosman mentionnent également une grande variabilité expérimentale, avec des constantes cinétiques calculées variant de 2 ordres de grandeur entre les valeurs les plus extrêmes. Ainsi, les caractéristiques de la désensibilisation de GLIC sont une question qui, encore aujourd'hui, fait débat au sein de la communauté.

4.2 Structures à haute résolution de GLIC

GLIC a été le deuxième membre de la famille des RCPs dont la structure à haute résolution a été obtenue par diffraction aux rayons X.

GLIC est un homopentamère dont chaque monomère est formé d'un domaine extracellulaire (ECD) organisé en sandwich β , et d'un domaine transmembranaire (TMD) formé de 4 hélices α (M1-M2), les hélices M2 du TMD de chaque monomère formant le canal du récepteur (Figure 4.2). A l'inverse de la plupart des membres eucaryotes de la famille, GLIC ne possède pas de domaine intracellulaire, de sites de modifications post-traductionnelles, ou encore de pont disulfure au sein de la boucle 7 (ce pont disulfure très conservé chez les autres membres donne à la famille le nom de récepteurs cys-loop). Néanmoins, il présente une architecture hautement similaires aux autres RCPs, faisant de ce récepteur un modèle structural « simplifié » de la famille (Figure 5.1).

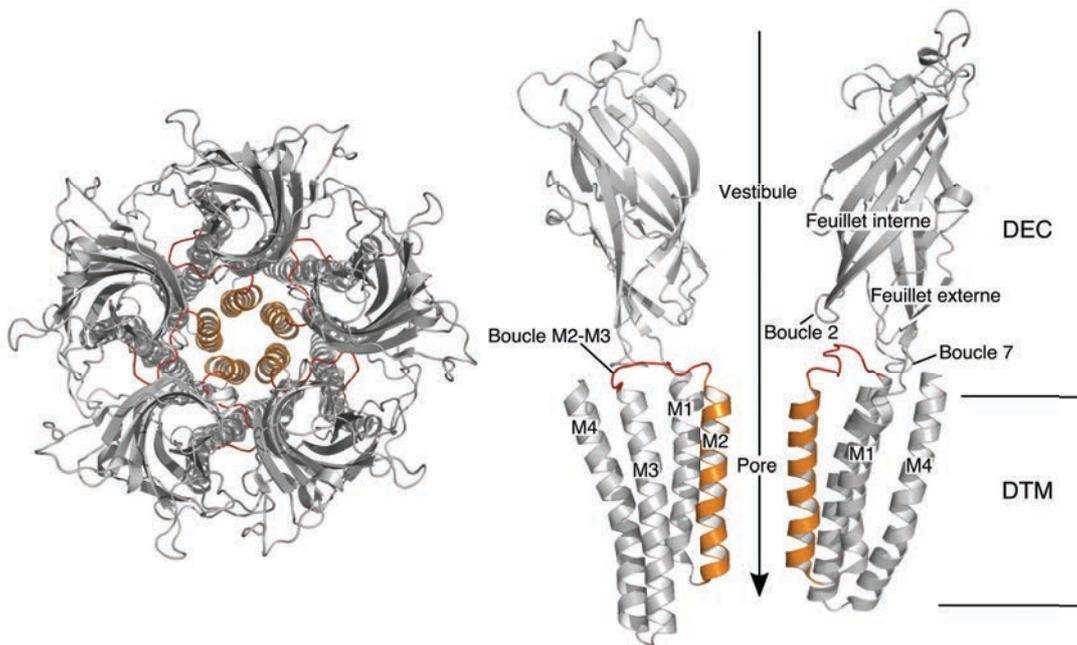


Figure 4.2 : Structure de GLIC. A gauche, vue de haut de GLIC montrant l'organisation symétrique des cinq sous-unités, formant au centre le pore du récepteur. A droite, vue de côté de GLIC, seules deux sous-unités sont représentées par souci de clarté. L'espace au centre du récepteur au niveau de l'ECD est dénommé vestibule, c'est le point d'entrée des ions. Le pore est lui formé par les hélices M2 (en orange) de chaque sous-unité, la boucle M2-M3 est elle colorée en rouge.

4.2.1 Structure obtenue à pH7

L'obtention d'une structure de GLIC en absence d'agoniste a été un long procédé nécessitant le test de plus de 1000 cristaux. Néanmoins, en 2014 a été publié la structure à haute résolution de GLIC à pH7 (Sauguet et al., 2014).

Au niveau de l'ECD, la structure de GLIC à pH7 est caractérisée par une conformation « relâchée » des sous-unités, qui interagissent peu entre elles générant ainsi de larges régions accessibles au solvant le long de l'interface. Le récepteur ayant été cristallisé dans un groupe d'espace comportant quatre pentamères dans l'unité asymétrique, il est possible de superposer les 20 chaînes monomériques pour étudier les variations intrinsèques dans la structure de GLIC. Cette superposition permet de mesurer une grande flexibilité quaternaire au sein de l'ECD (Figure 4.3). Cette flexibilité est également observée pour la boucle C, boucle qui encadre la poche de liaison de l'agoniste chez les autres récepteurs de la famille.

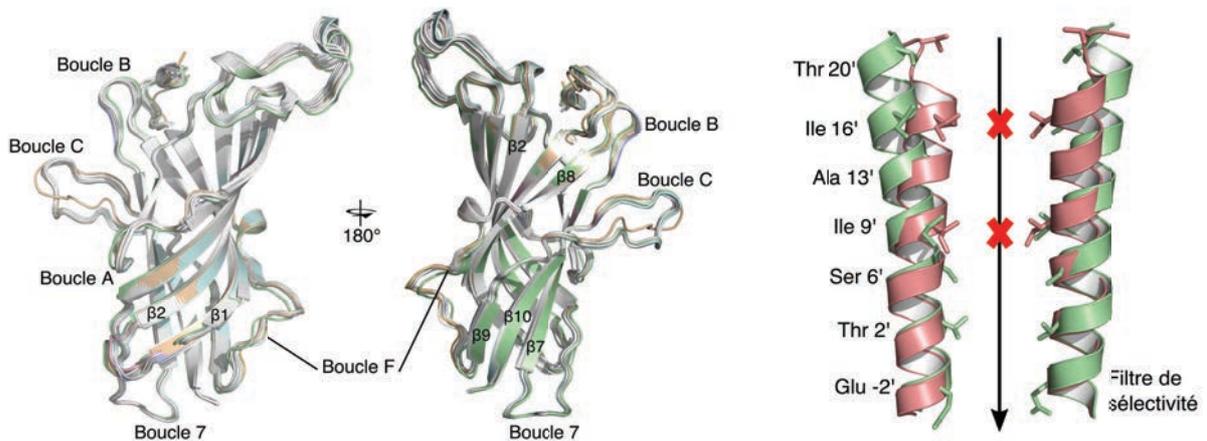


Figure 4.3 : Eléments structuraux de GLIC. A gauche sont représentés tous les ECD de chacune des 20 sous-unités observées dans l'unité asymétrique des cristaux de GLIC en absence d'agoniste. Les sous-unités ayant, à une position ou une autre au sein de l'ECD, une conformation « extrême » sont colorées, les autres sous-unités sont en blanc. A droite, le canal de GLIC fermé (rouge) et ouvert (vert) sont superposés, seules deux hélices (deux sous-unités) sont représentées par souples de clarté. La notation en ' des résidus est détaillée. Tous les acides aminés bordant le canal sont représentés pour la structure ouverte, et seuls les acides aminés formant les points de constriction au sein de la structure fermée sont représentés (16' et 9').

Au niveau de l'interface entre ECD et TMD, certaines boucles, notamment la boucle 2, la boucle 7 et la boucle F, cette dernière étant peu conservée au sein de la famille, montrent également une importante flexibilité.

Au niveau du TMD, les hélices M2 apparaissent droites, avec deux points de constriction au niveau de l'isoleucine 16' (2Å de rayon) et de l'isoleucine 9' (1,7Å de rayon). La géométrie du pore de GLIC n'est ainsi pas compatible avec la perméation d'un ion hydraté et cette conformation est donc définie comme non-conductrice (Figure 4.3).

La cristallisation de GLIC en absence d'agoniste (pH7) présentant un ECD relâché et un TMD incompatible avec le passage d'ions est donc associée à l'état de repos de la protéine.

4.2.2 Structure à pH4

Une première structure a été obtenue sur les récepteurs en présence de concentration d'agoniste produisant une réponse physiologique maximale (pH4,5) à une résolution de 2,9Å (Bocquet et al., 2009). Par la suite, de nouveaux essais de cristallisation ont permis d'améliorer la résolution de cette structure à 2,4Å (Sauguet et al., 2013c).

Les structures de GLIC obtenues en présence d'agoniste ne présentent pas la conformation relâchée de l'ECD typique de l'état de repos. Au contraire, les sous-unités interagissent amplement entre elles avec une augmentation de la surface d'interaction de 180Å² au niveau de l'ECD (Sauguet et al., 2014).

Au niveau de l'interface entre sous-unités, la boucle M2-M3, qui relie le pore au reste du TMD et effectue de nombreuses interactions avec l'ECD, apparaît orientée vers l'arrière.

Au niveau du TMD les hélices M2 sont déplacées par rapport à la structure à pH7 par un mouvement de rotation qui résulte en une conformation où les chaînes latérales des acides aminés hydrophobes ne pointent plus vers le pore mais vers les hélices adjacentes. De part cette rotation des hélices, le volume du pore est largement augmenté, le point de constriction se situant non plus au niveau des résidus hydrophobes (rayon de 4Å à la position 9') mais entre les résidus 2' et -2' (Figure 4.3).

Ces résidus ont été identifiés comme formant le filtre de sélectivité des récepteurs, sélectionnant les ions selon leur charge et permettant la séparation entre les récepteurs anioniques et cationiques (Corringer et al., 1999; Galzi et al., 1992).

L'obtention d'une structure à haute résolution a permis l'identification claire de trois pentagones d'eau dans le pore : le premier se situe juste sous le résidu 9', le second au niveau du résidu 6', suivi d'un ion sodium au niveau 2' et enfin le troisième pentagone situé sous l'ion sodium (Figure 4.4).

Les auteurs réalisent alors des simulations de dynamique moléculaire afin de faire passer un ion à travers le pore. Ils décrivent ainsi des différences d'hydratation au sein du pore mais précisent que les pentagones d'eaux sont constamment présents et proposent un rôle de ces pentagones dans le maintien d'une couche d'hydratation pour l'ion sodium lorsqu'il passe à travers le pore et notamment les deux sites de constriction en 9' et 2'. De plus, les simulations montrent que les chaînes latérales des résidus en 6' et -2' accompagnent le mouvement de l'ion vers le bas du pore, et le cytoplasme. Il est intéressant de noter qu'un mécanisme similaire a été proposé pour le récepteur nACh musculaire au niveau des résidus -1', et qu'il est donc raisonnable de considérer ce mécanisme comme celui relatant la perméation des ions des récepteurs cationiques (Cymes et al., 2002).

Enfin, la conformation observée de GLIC, obtenue en présence d'agoniste et étant compatible avec la perméation d'ions, nous permet de l'associer à l'état actif de la protéine.

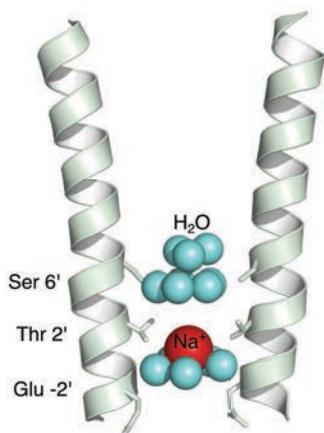


Figure 4.4 : Pore de GLIC ouvert. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères bleues, le Na^+ par une sphère rouge. Les résidus interagissant avec ces molécules sont représentés par des bâtons.

4.2.3 Une troisième conformation de GLIC localement fermée

La mutagenèse de GLIC au sein de régions supposées critiques pour le couplage entre domaines, ou la réalisation de ponts disulfures entre l'ECD et le TMD, ont abouti à la cristallisation de la protéine dans une nouvelle conformation généralement décrite par le terme « locally-closed » ou LC (Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2012). Sa dénomination reflète cette conformation particulière, toujours obtenue en présence d'agoniste, où l'ECD est similaire à celui de GLIC_{pH4} mais le TMD similaire à celui de GLIC_{pH7}. En d'autres termes, une description volontairement simplifiée serait de dire que la structure de GLIC présente un ECD actif et un TMD repos (Figure 4.5 A). Notons que si les premières structures LC ont été obtenues sur des récepteurs mutés, l'insertion d'un tag-histidine en position C-terminale de GLIC sauvage a abouti à l'obtention de cristaux où les deux formes, active et LC, coexistent (Sauguet et al., 2014).

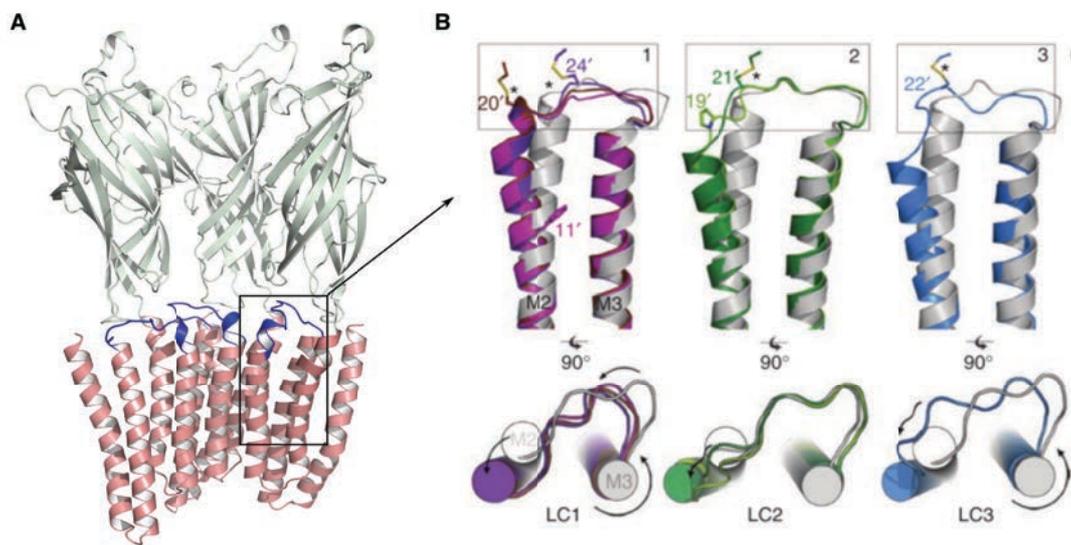


Figure 4.5 : Forme localement fermée de GLIC. A : Vue de côté de GLIC LC1, la conformation de l'ECD est similaire à celle de GLIC_{pH4} (vert), la conformation du TMD similaire à GLIC_{pH7} (rouge), le haut de M2 et la boucle M2-M3 (bleu) varient entre les différentes conformations LC. B : Zoom des hélices M2 et M3 pour les trois conformations LC alignées (couleur) à GLIC_{pH4} (blanc), avec une vue de côté et une vue de haut (Prevost et al., 2012).

Il existe en réalité plusieurs conformations LC qui diffèrent en un point critique, la position de la boucle M2-M3. Dans la conformation LC1, la boucle M2-M3 est similaire à GLIC_{pH7} et dans LC3 la boucle M2-M3 est très flexible et visite plusieurs conformations. Dans le cas de la conformation LC2, la boucle M2-M3 est similaire à GLIC_{pH4} alors que le reste du TMD et notamment le pore est similaire à GLIC_{pH7} (Figure 4.5 B). Cette conformation, observée également sur le récepteur glycine pour une protéine chimérique (l'ECD de GLIC et le TMD du glycine) pourrait avoir un rôle dans la transition de repos vers actif et est proposée comme un intermédiaire structural dans cette transition (Moraga-Cid et al., 2015; Prevost et al., 2013b).

4.3 Un modèle de transition

L'étude des structures de GLIC à pH7 et à pH4 permet de proposer un modèle de transition entre les deux conformations (Figure 4.6).

Au niveau de l'ECD, le passage de la conformation fermée-relâchée à la conformation ouverte implique une compaction des ECDs qui s'effectue en deux mouvements : un mouvement de translation radial décrit comme « un-blooming », c'est à dire qui s'apparente à l'éclosion d'une fleur (lorsque l'on passe de pH4 à pH7), et un mouvement tangentiel de rotation, ou « twist ». Ces observations structurales ont également été proposées par des études en modes normaux réalisées sur GLIC ou d'autres RCPs (Bertaccini et al., 2008; Sauguet et al., 2014; Taly et al., 2005a). A l'interface, ces mouvements s'apparentent à un glissement du feuillet β , de la sous-unité $i+1$ par rapport à la sous-unité i , de la taille d'un brin β . La pointe de la boucle C suit le mouvement de translation de la sous-unité $i+1$, résultant en une compaction de la poche orthostérique, site de liaison des neurotransmetteurs chez les récepteurs eucaryotes.

A l'interface entre ECD et TMD on observe un mouvement de la boucle 2 vers l'intérieur de la sous-unité, renforçant ainsi les interactions de cette boucle située à l'intérieur de la protéine avec la région précédant l'hélice

M1 (pré-M1) située vers l'extérieur de la protéine, notamment par la formation d'un pont salin très conservé au sein de la famille. De même, les deux feuillets β formant le sandwich β de l'ECD se compactent, entraînant une forte diminution de volume de la cavité intra-sandwich. La boucle M2-M3 effectue également un mouvement vers l'arrière, tournant autour de l'hélice M3 agissant ainsi comme la charnière d'une porte.

Au niveau du TMD, les hélices M2 basculent vers l'arrière avec un mouvement rotationnel, similaire à l'ouverture d'un iris. Cette rotation entraîne l'écartement hors du pore des chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes et ainsi permet l'ouverture du pore. Ce mouvement implique également un rapprochement des hélices M2 et M3, et par extension des hélices M1 complémentaires.

Ces réorganisations quaternaires sont accompagnées de nombreuses réorganisations tertiaires, tout particulièrement aux interfaces, où les réseaux d'interactions entre chaînes latérales sont réorganisés. De part leur importance pour l'ouverture du canal et la stabilisation de l'état actif, on peut notamment citer, en plus du pont salin précédemment décrit, le mouvement de la proline 23' située sur M2-M3, proline canoniquement conservée au sein de la famille, qui passe sous la position 33 à la pointe de la boucle 2 lors du mouvement arrière de la boucle M2-M3 (Figure 4.6, encarts). Cette interaction entre les deux positions stabilise ainsi la conformation active de la boucle M2-M3 et par extension, l'ouverture du pore (Calimet et al., 2013; Hibbs and Gouaux, 2011; Sauguet et al., 2014). De même, la leucine 22' située sur M2, passe d'une orientation vers le bas dans GLIC_{pH7} à une orientation vers le haut dans GLIC_{pH4} où le résidu effectue de nombreuses interactions, notamment avec les résidus F116 et Y119 de la boucle 7 (Figure 4.6, encarts).

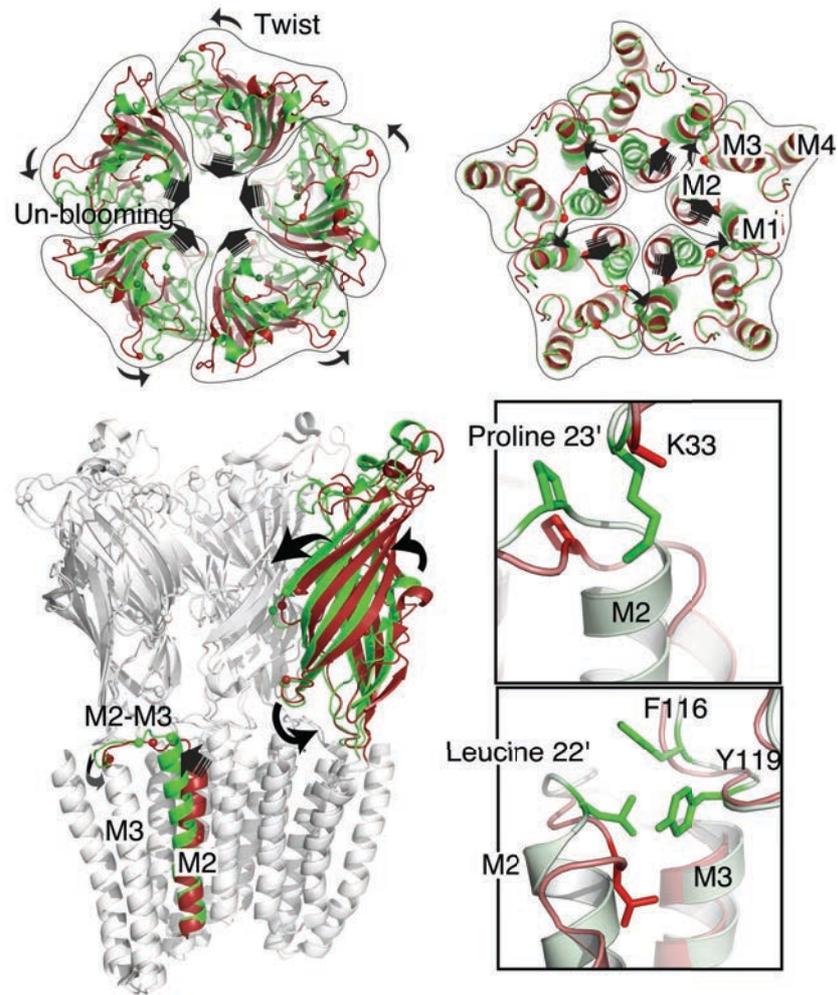


Figure 4.6 : Transitions de GLIC. Dans toute la figure GLIC_{pH7} est en rouge et GLIC_{pH4} en vert. La figure présente une vue de haut de l'ECD et du TMD, les flèches indiquant les mouvements effectués par chaque région dans la comparaison pH7 vers pH4. Dans la vue de côté, deux sous-unités ont été enlevées pour permettre de voir l'intérieur de la protéine. Les encarts sont des zooms du haut de l'hélice M2 montrant les acides aminés dont les réorganisations sont commentées dans le texte, en haut la proline 23', en bas la leucine 22'.

La « place » de la conformation LC dans cette transition de repos à actif est ainsi facile à imaginer en termes séquentiels. On peut proposer un modèle en deux étapes : 1) l'ECD effectue les mouvements de contraction tangentiels et radiaux, alors que le pore du récepteur reste fermé, 2) le TMD transite vers la conformation active avec l'ouverture du pore. La possibilité de cette transition séquentielle sera largement abordée dans la discussion générale de ce manuscrit.

5. Structures de RCPs

5.1 Etat des connaissances

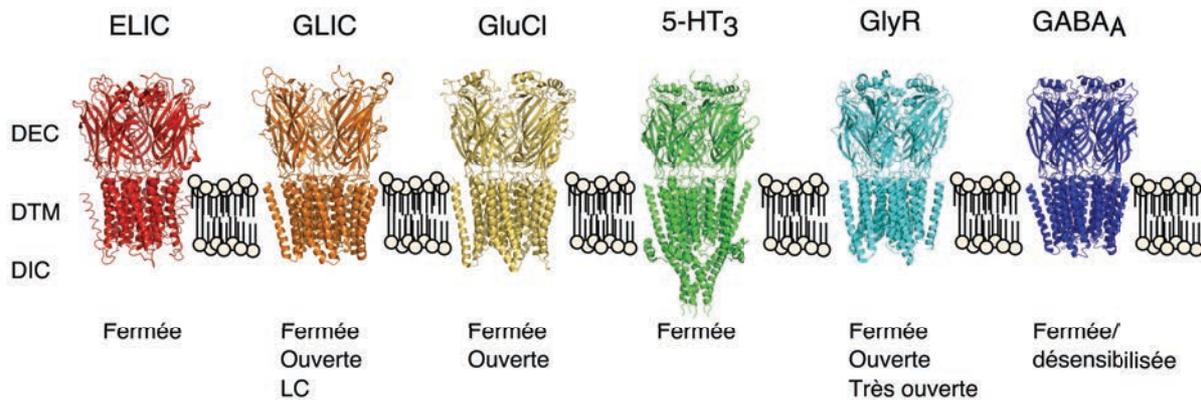


Figure 5.1 : Sous-types de récepteurs dont la structure est connue. Sous les structures sont indiquées les différentes conformations dans lesquelles les récepteurs ont été observés par cristallographie ou microscopie électronique (récepteur glycine).

Au cours des dernières années un grand nombre de structures à haute résolution des RCPs ont été publiées. La toute première structure obtenue d'un récepteur de la famille l'a été par microscopie électronique sur le récepteur nicotinique musculaire à une résolution de 4Å (Miyazawa et al., 2003; Unwin, 2005). Les premières structures cristallographiques à haute résolution ont elles été obtenues sur des homologues bactériens de la famille, GLIC et ELIC, plus faciles à exprimer en grandes quantités et à purifier, et dénués du grand domaine intracellulaire présent chez les RCPs vertébrés, particulièrement flexible et donc peu cristallogène (Bocquet et al., 2009; Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Hilf and Dutzler, 2009, 2008; Pan et al., 2012; Prevost et al., 2012; Spurny et al., 2012).

Ces structures ont été suivies par la publication de la première structure à haute résolution d'un RCP eucaryote, le récepteur GluCl α de *C. elegans* (Hibbs and Gouaux, 2011).

Différentes structures de protéines chimériques, comprenant l'ECD d'un sous-type et le TMD d'un autre, ont également été obtenues, soulignant le

caractère modulaire de ces récepteurs et leur grande homologie structurale (Moraga-Cid et al., 2015; Schmandt et al., 2015).

Au cours des deux dernières années, GLIC et GluCl α ont été cristallisés dans leurs formes non-ligandé (Althoff et al., 2014; Sauguet et al., 2014) et les premières structures de récepteurs mammifères ont été publiées, comprenant le récepteur du poisson zèbre α 1-Gly en trois conformations différentes (Du et al., 2015), le récepteur humain α 3-Gly (Huang et al., 2015), le récepteur humain GABA $_A$ β 3 (Miller and Aricescu, 2014), le récepteur de souris 5-HT3A en présence d'anticorps (Hassaine et al., 2014) et enfin, à plus faible résolution, le récepteur de souris 5-HT3A en absence de ligand et reconstitué en liposomes (Kudryashev et al., 2016).

La publication de ces nouvelles structures, pour beaucoup dans différentes conformations, permet de poser un regard nouveau sur les transitions allostériques des RCPs. Ces études montrent que les récepteurs mammifères, et même humain, peuvent à ce jour être purifiés en quantités suffisantes pour des analyses biophysiques et biochimiques, le prochain « défi » du domaine étant l'obtention de structures de récepteurs hétéromériques, ces récepteurs étant extrêmement représentés au sein du système nerveux.

Afin d'étudier les transitions entre états des RCPs, notamment par l'analyse de leurs structures, il convient d'essayer d'associer chaque structure à un état existant à la membrane. Les structures à hautes résolution des RCPs étant obtenues avec des récepteurs extraits de leurs membranes physiologiques et, dans le cas de la cristallographie, « piégés » au sein d'un réseau cristallin, l'association d'une structure à un état physiologique doit toutefois être considérée avec prudence.

5.2 Structures type repos

Le récepteur GluCl α cristallisé dans sa forme apo (en absence de ligand) présente un point de constriction en son pore, au niveau du résidu leucine 9', de 1,5Å de rayon (Althoff et al., 2014). Les structures des récepteurs glycine α 1 (obtenues par microscopie électronique) et α 3 (obtenue par

cristallographie) en présence d'un antagoniste, la strychnine, présentent également des points de constriction dans leurs pores au niveau des résidus leucine 9' (1,4Å) et des résidus 13' et 20' (2-3Å) (Du et al., 2015; Huang et al., 2015) (Figure 5.2). Ces points de restrictions de résidus hydrophobes sont incompatibles avec la présence d'eau générant ainsi une barrière énergétique infranchissable pour un ion et permettent d'assigner ces structures à des états non-conductants.

Toutefois, l'assignation à un état physiologique précis peut rester difficile. En effet, dans le cas du récepteur GluCl, ayant été cristallisé en absence de ligand et présentant un pore fermé, il peut être associé à un état de repos. Par contre, les structures des récepteurs glycines ayant été obtenues en présence d'un antagoniste, leur conformation peut différer de l'état de repos-apo du récepteur.

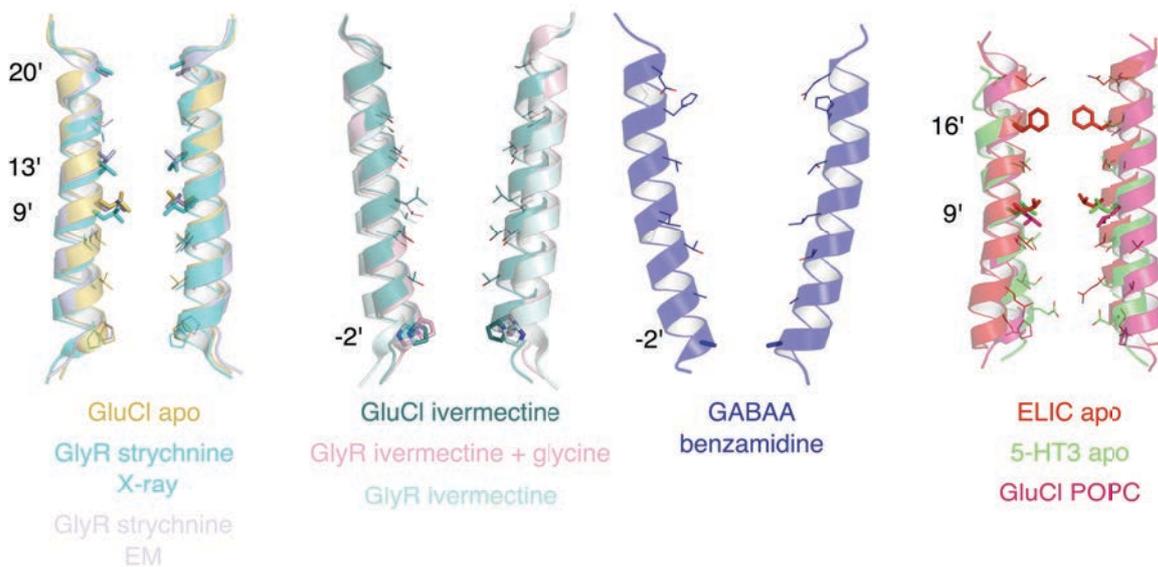


Figure 5.2 : Pores des récepteurs. Les différentes structures obtenues ont été classifiées en quatre groupes, de gauche à droite : repos, actif, désensibilisé, non classées. Les structures de chaque groupe ont été superposées et seules les hélices M2 de deux sous-unités sont montrées par souci de clarté. Les acides aminés bordant le pore sont représentés par des lignes et les acides aminés responsables de points de restrictions dans le pore par des bâtons. La notation en ' de ces acides aminés est indiquée à côté des hélices.

5.3 Structures type actif

Le récepteur GluCl α , cristallisé en présence d'ivermectine (ce récepteur étant activé par l'ivermectine et non par le glutamate), et le récepteur glycine α 1, dont la structure a été résolue en présence de glycine et ivermectine, montrent un large pore et l'ouverture des points de constriction aux positions 9' et 13' (Althoff et al., 2014; Du et al., 2015). La constriction du pore se situe, pour ces structures, aux positions 2' et -2' qui ont été identifiées comme créant le filtre de sélectivité des RCPs, sélectionnant les ions selon leur charge.

L'étude du mécanisme permettant aux ions de traverser le pore, réalisée sur GLIC et détaillée dans la partie 4.2, propose qu'un ion traversant la partie inférieure du pore perde partiellement sa couche d'hydratation et interagissent avec les molécules d'eau mobiles présentes dans ces régions. Ainsi le point de constriction au niveau du filtre de sélectivité se situant entre 2 et 2,5Å, il n'est pas incompatible avec le passage d'un ion partiellement déshydraté, les résidus chargés au niveau 2' interagissant avec l'ion et « l'accompagnant » vers le cytoplasme (Sauguet et al., 2013b).

Ces structures ayant été obtenues en présence de l'agoniste de chaque récepteur, il est raisonnable de proposer qu'elles puissent représenter leurs états actifs respectifs. Notons d'ailleurs que ces différentes structures, en incluant GLIC_{pH4}, sont globalement très similaires, comme illustré au niveau du pore, figure 5.2.

La structure du récepteur glycine α 1 a également été résolue en présence uniquement de glycine. Cette structure présente une conformation particulière avec un pore largement ouvert, notamment au niveau du filtre de sélectivité avec un diamètre de 8,8Å. Or, des études testant la perméabilité d'ions de différents diamètres ont évalué que le diamètre du pore du récepteur glycine, recombinant ou exprimé dans les neurones, se situe entre 5,44Å et 5,2Å (Bormann et al., 1987; Rundström et al., 1994). Ainsi, si cette conformation peut certainement laisser passer des ions de différentes tailles, et qu'il est établi que le récepteur glycine existe dans

des états de différentes conductances, il n'est pas encore possible de l'assigner un état physiologique.

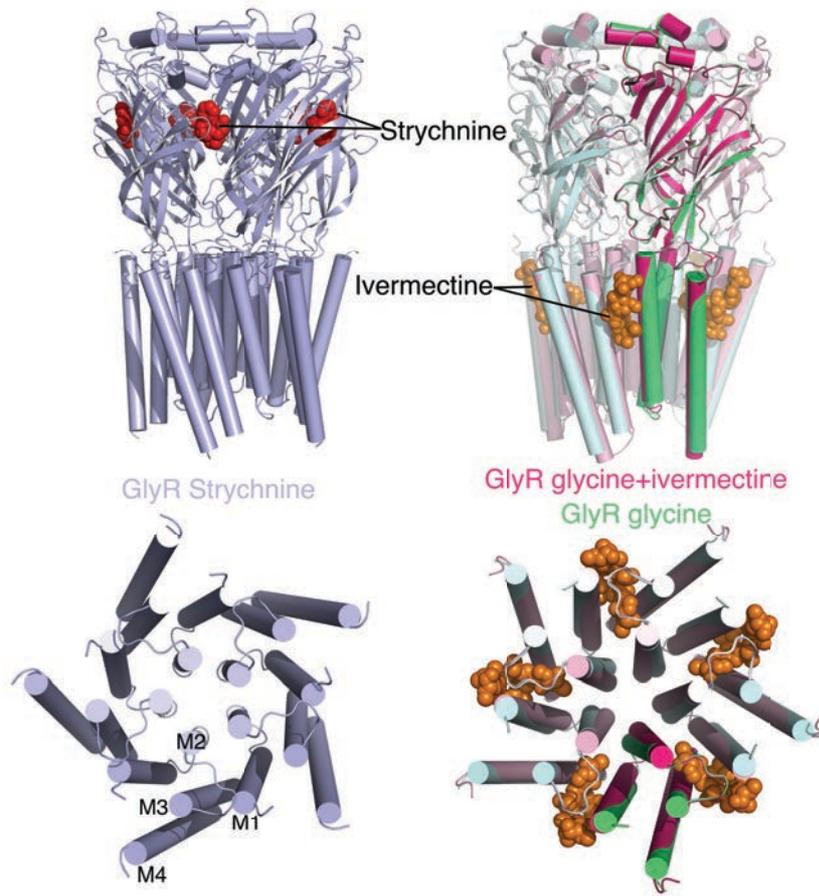


Figure 5.3 : Structures du récepteur glycine. Le récepteur glycine présentant un pore fermé et en présence de strychnine est représenté en violet. Les récepteurs présentant un pore ouvert, dont la structure a été résolue en présence d'ivermectine (structure verte) et glycine (structure rose) sont superposées afin d'illustrer leurs différences au sein du TMD.

5.4 Structure type désensibilisée

La structure du récepteur homomérique humain GABA_Aβ3 (notons que ce récepteur n'est pas exprimé chez l'humain mais le gène codant pour la sous-unité β3 est un gène humain) a été obtenue en présence d'un nouvel agoniste, le benzamidine. L'architecture du pore de ce récepteur diffère des autres structures connues, les hélices M2 formant le pore étant arrondies et le TMD dans son ensemble montrant une rotation antihoraire

de 20°, générant un diamètre de 13,3Å au niveau 9' et un point de constriction de 3,15Å au niveau du filtre de sélectivité. Ce diamètre étant plus petit que les pores des conformations actives et le récepteur étant lié à un agoniste, les auteurs proposent que cette conformation représente un état désensibilisé du récepteur, la seule structure à ce jour assignée à cet état (Miller and Aricescu, 2014).

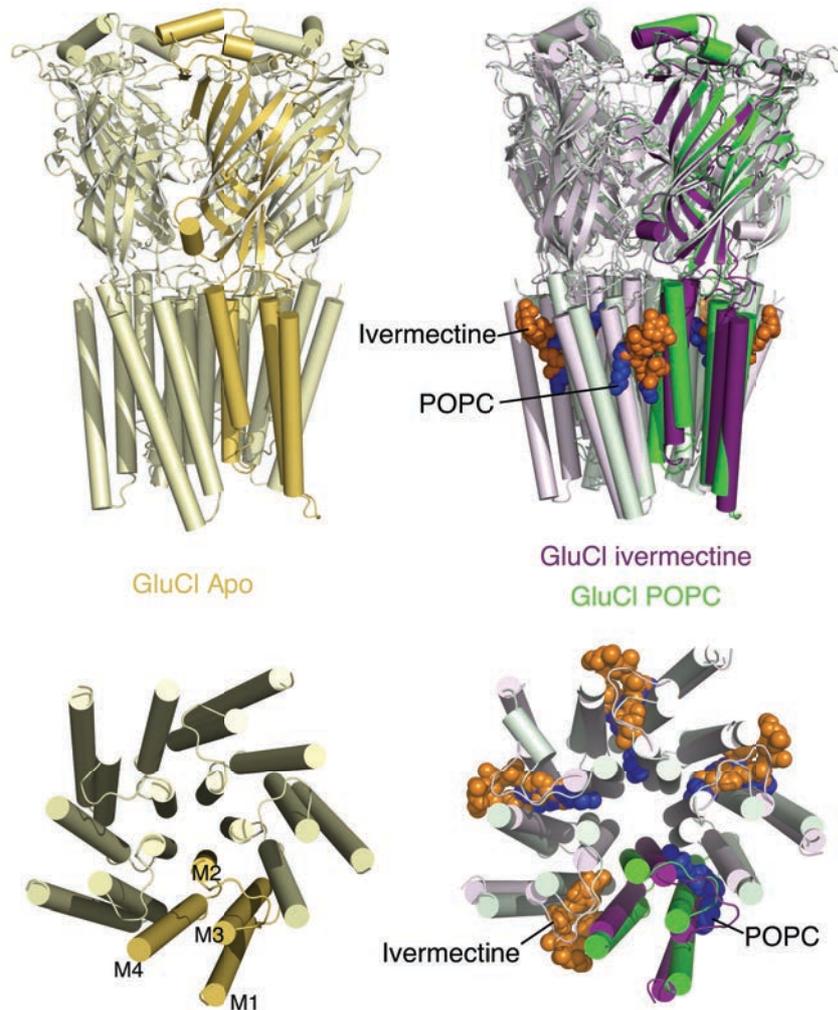


Figure 5.4 : Structures du récepteur GluCl. Le GluCl cristallisé en absence de ligand est représenté en jaune. Les récepteurs présentant un pore ouvert, dont la structure a été résolue en présence d'ivermectine (structure violette) ou en présence de POPC (structure verte) sont superposées afin d'illustrer leurs différences au sein du TMD. Sur la vue de haut du pore, une molécule de POPC et une d'ivermectine ont été enlevées pour plus de clarté.

5.5 Autres conformations

Le récepteur 5HT-3 présente un pore dont la conformation s'apparente aux structures de récepteurs ouverts, en terme de chaîne principale, mais présentant une constriction locale due à un rotamère particulier de la leucine 9' générant un diamètre de 2,3Å prédit pour empêcher un ion hydraté de passer à travers le pore. De plus, ce récepteur ayant été cristallisé avec une partie de son domaine intracellulaire, on peut identifier de multiples points de constriction au sein du « tunnel » formé par les hélices intracellulaires dont le rayon minimum est de 2,1Å, ce diamètre n'étant pas non plus compatible avec le passage d'un ion. Cette structure est ainsi difficile à classer, les auteurs proposant que le récepteur est cristallisé dans une conformation non-conductante (Hassaine et al., 2014).

Toutes les structures du récepteur ELIC, y compris de la protéine chimérique ELIC(ECD)/GLIC(TMD), présentent des points de constriction dans leur pore aux positions 16' et 9', pouvant ainsi être considérées comme fermées. Toutefois, l'observation d'un pore fermé sur ces récepteurs qu'ils soient en présence d'agoniste (Spurny et al., 2012) ou d'antagoniste (Pan et al., 2012) rend leur assignation à un état physiologique particulier difficile.

Le récepteur chimérique composé du domaine extracellulaire de GLIC et du domaine transmembranaire du récepteur glycine, dénommée Lily, a été cristallisé en présence d'agoniste, dans une conformation LC1 (Moraga-Cid et al., 2015). La conformation est décrite comme comportant un ECD actif et un TMD repos, néanmoins, le TMD de Lily diffère du TMD des récepteurs glycine en présence de leur antagoniste, notamment au niveau de la boucle M2-M3. Ces données montrent que le TMD du récepteur glycine peut adopter de multiples conformations fermées.

5.6 Transitions structurales déduites des structures

5.6.1 Transitions du récepteur GluCl α

La superposition des structures apo et ivermectine du GluCl α montrent une contraction du domaine extracellulaire de façon similaire au mouvement de blooming décrit pour GLIC, mais avec une amplitude plus faible, le récepteur GluCl α -apo ne présentant pas un ECD aussi relâché que GLIC_{pH7} (Figure 5.5). De même, les ECD effectuent, dans la comparaison apo vers ivermectine, un mouvement de translation radial, ou « twist ». Au niveau de l'interface entre sous-unités, ces deux mouvements entraînent un glissement du sandwich β de la sous-unité $i+1$, de l'ordre d'un brin β , par rapport à la sous-unité i (Figure 5.5). De plus, ces mouvements impliquent une compaction de l'interface entre sous-unités et ainsi la « fermeture » de la poche orthostérique, notamment par le mouvements des boucles A, B et C encadrant la poche coté i .

Le récepteur GluCl α est activé par l'ivermectine plutôt que le glutamate mais il retient la capacité de lier le glutamate au sein de la poche orthostérique, le glutamate agissant comme un potentialisateur. L'étude de cette poche dans les deux structures disponibles montre que les chaînes latérales des résidus arginine 123 et lysine 171 effectuent une rotation, la première « vidant » la poche et permettant ainsi la liaison du glutamate, la deuxième interagissant avec le glutamate via le résidu arginine 37 (Figure 5.5). Une fois au sein de la poche orthostérique, le glutamate effectue de multiples liaisons avec les résidus adjacents stabilisant ainsi la conformation « refermée » de la poche.

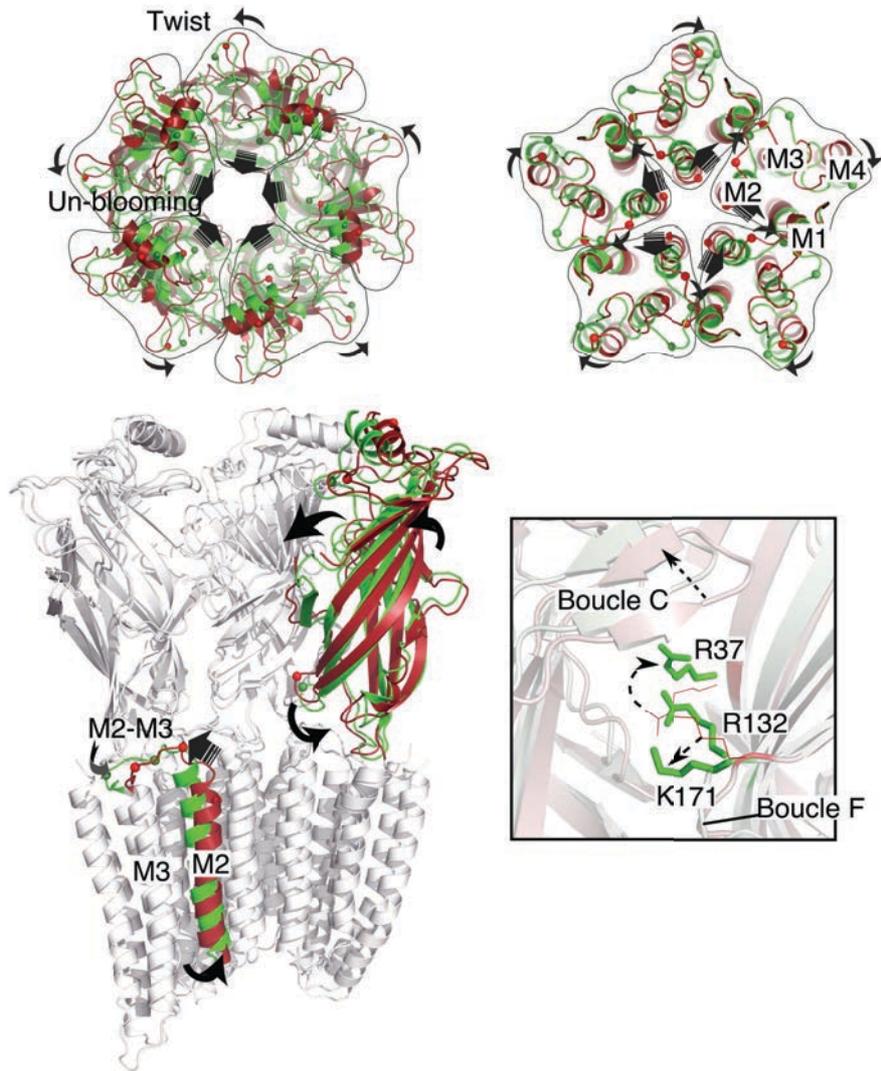


Figure 5.5 : Transition du récepteur GluCl α . Dans toute la figure, la structure du GluCl α -apo est colorée en rouge et la structure du GluCl α -ivermectine en vert. En haut : vue du dessus de l'ECD et du TMD, les flèches indiquant les mouvements effectués lors de la transition apo vers ivermectine. Sur la vue de côté du récepteur deux sous-unités ont été enlevées par soucis de clarté. L'encart présente un zoom de la poche orthostérique et les mouvements d'acides aminés de la poche sont représentés par des flèches. Dans cet encart, les structures ont été alignées sur la sous-unité de droite (i+1), les mouvements de l'ECD et notamment de la boucle C sont visibles sur la sous-unité de gauche (i).

Le TMD du récepteur en présence d'ivermectine effectue une rotation antihoraire globale entraînant la boucle M2-M3 vers l'arrière, se différenciant des mouvements plus locaux vus dans la transition de GLIC. L'ouverture du pore s'effectue par un mouvement de translation vers l'arrière et la transition du TMD dans son ensemble amène à une

conformation avec une large cavité entre les hélices M1 et M3, site de liaison de l'ivermectine. Si la transition du TMD du récepteur GluCl α diffère de celle de GLIC dans son ensemble, la réorganisation de certaines interactions à l'interface est similaire pour les deux récepteurs, leur conformation « active » étant très similaire.

5.6.2 Transition du récepteur glycine

Une des structures du récepteur glycine ayant été obtenue en présence d'un antagoniste, le point de « départ » de la transition étudiée est différent d'un récepteur apo-repos et ne peut ainsi pas être considérée comme équivalente aux transitions décrites pour les récepteurs GLIC et GluCl α . Toutefois, le mécanisme structural par lequel un antagoniste empêche la stabilisation d'un état actif des récepteurs n'étant pas connu, ces structures pourront peut-être permettre de répondre à ces questions.

Il est intéressant de noter que la structure –strychnine ne présente pas un ECD relâché comme GLIC_{pH7}, mais au contraire un ECD contracté dans sa partie supérieure avec une poche orthostérique fermée. La partie inférieure de l'ECD étant similaire à GluCl α -apo on peut spéculer que la liaison de l'antagoniste stabilise une conformation intermédiaire de l'ECD, mi-actif mi-repos, empêchant ainsi un mouvement complet nécessaire à l'activation du récepteur.

Le bas de l'ECD et le TMD des structures –strychnine étant similaires à la structure GluCl α -apo, la transition entre les deux états –strychnine et –ivermectine est similaire entre le récepteur glycine et le GluCl α (Figure 5.6).

Toutefois, il faut noter une différence entre les structures α 1-strychnine et α 3-strychnine au niveau de la boucle M1-M2, située sur le côté cytoplasmique des récepteurs, le récepteur α 3 montrant un twist par rapport au α 1 (Figure 5.2). A ce stade, il n'est pas possible d'attribuer cet effet à une différence entre les sous-types du récepteur ou une différence dans la technique utilisée pour résoudre la structure, cristallographie ou cryo-microscopie électronique respectivement.

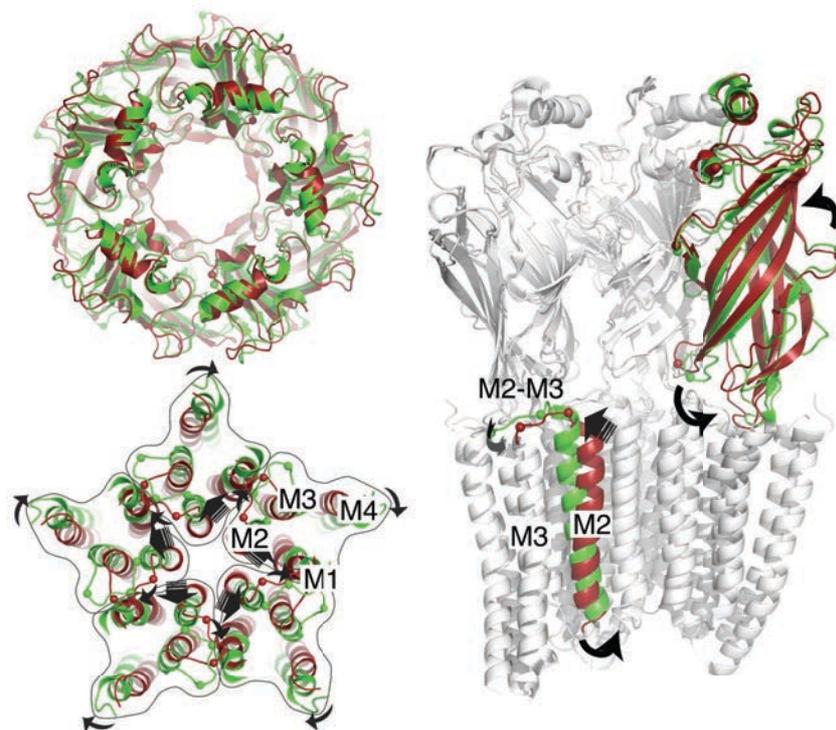


Figure 5.6 : Transition du récepteur glycine. Dans toute la figure, la structure du GlyR-strychnine est colorée en rouge et la structure de GlyR-ivermectine+glycine en vert. La figure présente deux vues du dessus, de l'ECD et du TMD. Sur la vue de l'ECD on peut voir qu'il n'y a que très peu de différence entre les deux structures. Sur la vue de côté de la structure entière deux sous-unités ont été enlevées par soucis de clarté.

6. Modulateurs des RCPs

De par leur rôle dans de nombreuses fonctions physiologiques et leur implication dans des pathologies sévères, de multiples agents pharmaceutiques ciblant les récepteurs-canaux ont été développés tels que les anesthésiques généraux, les anxiolytiques, les anti-convulsant et les agents antiémétiques, pour n'en citer que quelques-uns. Ils sont également largement modulés par l'alcool et les drogues à usage récréatif, telles que la nicotine ou encore la cocaïne. Les dernières années ayant été riches en études cristallographiques, cette partie sera traitée sous un angle structural avec une emphase sur GLIC.

6.1 Benzodiazépines

Les benzodiazépines (BDZ) sont une classe large de molécules ayant notamment des effets anti-convulsants, sédatifs et anxiolytiques. Leurs cibles principales dans le système nerveux sont les récepteurs GABA_A et il a aussi été montré que le récepteur procaryote ELIC est modulé par ces molécules. La co-cristallisation d'ELIC et de flurazepam a permis d'identifier deux sites de liaison au sein de l'ECD du récepteur, un site inter-sous-unité, recouvrant partiellement la poche orthostérique, et un site intra-sous-unité faisant face au vestibule. Le site inter est proposé comme le site d'inhibition du récepteur par les BDZs. Le site intra, situé de l'autre côté du « mur » formé par le feuillet β encadrant le site de liaison du GABA est proposé comme le site responsable de l'effet de potentialisation du flurazepam (Spurny et al., 2012).

Cependant, ces hypothèses formulées à partir des structures du récepteur ELIC ne sont pas en accord avec toutes les observations faites sur les récepteurs GABA_A. En effet, il est proposé que, pour ces derniers, les BDZ se lient au sein du site inter mais ne sont cependant pas inhibiteurs, leur liaison se faisant à l'interface $\alpha\gamma$ qui ne lie pas l'agoniste. Ainsi, il est proposé que leur effet potentialisateur résulte d'une stabilisation d'un état

de haute affinité pour le GABA, en augmentant ainsi la constante de pré-activation des récepteurs (Gielen et al., 2012).

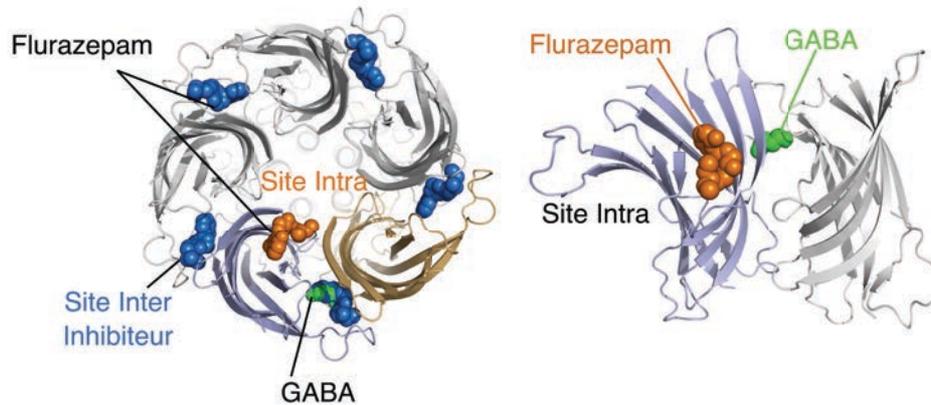


Figure 6.1 : Sites des benzodiazépines. Structure de ELIC cristallisé en présence de flurazepam et GABA. A gauche : vue de haut du récepteur, seules deux sous-unités sont colorées. Au sein du site orthostérique, le GABA et le flurazepam ont volontairement été représentés ensemble pour montrer leur localisation similaire. A droite : Vue depuis le vestibule de deux ECD montrant le site intra sous-unité du flurazepam et le site du GABA au sein de la poche orthostérique.

6.2 Anesthésiques généraux et alcool

Les anesthésiques généraux (AGs) sont couramment utilisés en médecine et ont de multiples cibles protéiques, parmi lesquelles les RCPs jouent un rôle majeur. Plus précisément, les AGs inhibent les courants excitateurs des nAChRs et potentialisent les courants inhibiteurs des GABA_A et GlyRs.

Des études électrophysiologiques ont montré que la fonction de GLIC est négativement modulée par les anesthésiques généraux halogénés tels que le desflurane, l'halothane et l'isoflurane. Dans une plus faible mesure, le propofol et le xénon ont également un effet inhibiteur des courants de GLIC. Ces inhibitions sont observées pour des doses cliniques de composés, et même inférieures à celles couramment utilisées en anesthésie (Weng et al., 2010).

Les mesures fonctionnelles effectuées sur GLIC montrent qu'il est potentialisé en présence d'alcools à courtes chaînes, et inhibé par les alcools à longues chaînes, comme cela est aussi observé pour le nAChR. Toutefois, les effets potentialisateurs de l'éthanol ne sont observés qu'à des concentrations bien supérieures à celles physiologiquement pertinentes. La mutation d'un résidu de l'hélice M2 (F14') pointant vers l'intérieur du TMD a cependant permis de conférer à l'éthanol un caractère potentialisateur puissant, le rendant effectif à des concentrations pouvant être observées chez l'humain dans le cadre de l'intoxication alcoolique. La présence de la mutation F14'A impacte également l'effet du bromoforme (dérivé du chloroforme) sur GLIC, en changeant son effet inhibiteur en un effet de potentialisateur (Howard et al., 2011; Sauguet et al., 2013a).

La cristallisation de GLIC en présence de desflurane ou de propofol a permis d'identifier un site de liaison de ces molécules dans la partie supérieure du TMD, au sein d'une cavité intra-sous-unité, préexistante en absence d'anesthésiques. Il est d'ailleurs intéressant de noter qu'une étude sur le nAChR a permis de localiser le site de liaison du propofol au sein de cette cavité intra (Jayakar et al., 2013). Cette cavité, accessible depuis la membrane lipidique, est reliée à une deuxième cavité, à l'interface entre sous-unités, non-accessible de l'extérieur de la protéine (Figure 6.2) (Nury et al., 2011).

Des comparaisons de séquence avec les récepteurs GABA_A et GlyR, pour lesquels l'effet des anesthésiques est potentialisateur, indiquent que les acides aminés impliqués dans la liaison aux anesthésiques généraux se situent au même endroit que la cavité inter-sous-unité décrite chez GLIC. Dans les travaux de co-cristallisation sur le récepteur sauvage, la présence des anesthésiques n'a été observée que dans la cavité intra chez GLIC, mais des simulations de dynamique moléculaire ont permis de montrer que les anesthésiques généraux, et plus particulièrement le propofol, pouvaient passer d'une cavité à l'autre (Figure 6.2). De plus, la co-cristallisation de GLIC F14'A et du bromoforme montre que l'anesthésique est présent dans la cavité inter lorsqu'il a un effet

potentialisateur sur GLIC (tout comme sur les anioniques) alors qu'il est majoritairement présent dans la cavité intra lorsque son effet est inhibiteur (en absence de la mutation 14'). De même, la structure de GLIC F14'A co-cristallisé en présence d'éthanol indique une occupation de la poche inter par la molécule.

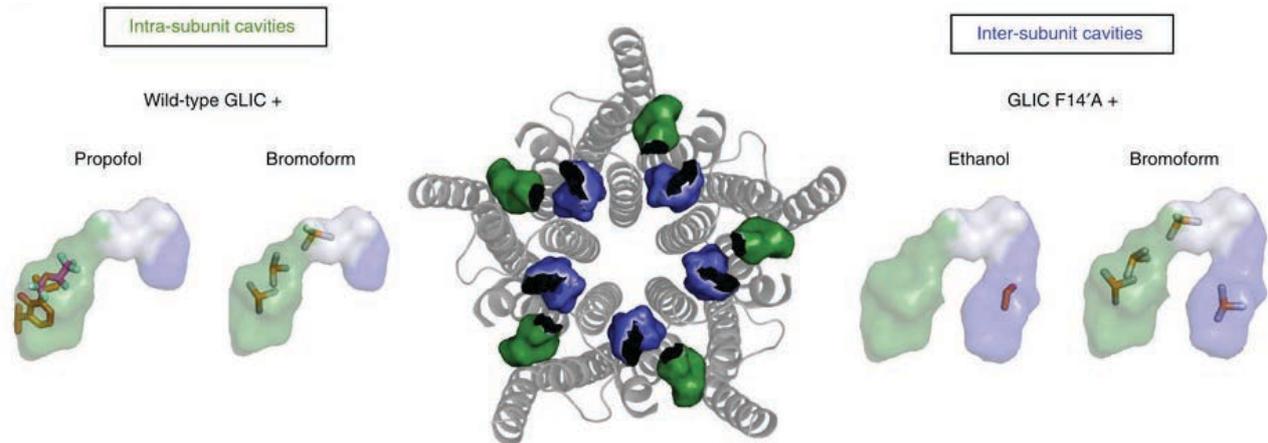


Figure 6.2 : Sites anesthésiques de GLIC. Au centre, une vue de dessus du pore de GLIC_{pH4} avec les volumes des deux poches anesthésiques, la poche intra sous-unité est en vert, et la poche inter sous-unité en bleu. A gauche du TMD sont représentées les deux cavités et leur occupation par le propofol et le bromoforme. A droite sont représentées les mêmes cavités observées sur la structure de GLIC portant la mutation F14'A, montrant que l'éthanol et le bromoforme visitent la cavité inter sous-unité. Figure tirée de (Sauguet et al., 2013a).

Des études en RMN des TMD des sous-unités nicotiques $\alpha 7$ et $\alpha 4\beta 2$ en présence d'anesthésiques volatils permet également d'identifier les cavités précédemment décrites chez GLIC, dans le récepteur nicotinique. Il est intéressant de noter que les auteurs observent des différences dans la compaction des hélices entre les domaines isolés de ces deux récepteurs générant un volume différent de la cavité de liaison de l'isoflurane, 180\AA^2 pour $\beta 2$ et 120\AA^2 pour $\alpha 7$. Ils ont donc proposé que la plus petite cavité d' $\alpha 7$ expliquerait son insensibilité à l'isoflurane (Cui et al., 2012; D. D. Mowrey et al., 2013).

Ainsi, la description de ces deux cavités chez GLIC, l'une inhibitrice et l'autre potentialisatrice, permet d'avancer dans la compréhension des

mécanismes moléculaires par lesquels les anesthésiques généraux, ou l'alcool, modulent la fonction des RCPs. S'il n'est toutefois toujours par possible de proposer un modèle définitif, la localisation de ces poches au sein du TMD, et pour la poche intra, juste derrière les hélices M2 bordant le pore, un mécanisme d'interaction directe avec le canal peut être envisagé.

Il est toutefois important de modérer ces conclusions en rappelant l'apparente contradiction entre les effets inhibiteurs des anesthésiques généraux sur GLIC (en absence de la mutation F14'A) et leur co-cristallisation avec la protéine dans une conformation supposée active. Toutefois, il est raisonnable d'envisager que si les anesthésiques peuvent se lier sur l'état actif des récepteurs, ils montrent une plus grande affinité pour un état fermé qu'ils stabilisent. Cette idée est soutenue par les expériences fonctionnelles réalisées sur GLIC montrant que les effets modulateurs de ces molécules sont plus importants à basses concentrations d'agoniste (EC₂₀) où l'équilibre fermé-actif n'est pas fortement déplacé vers l'état actif.

Très récemment, une étude sur GLIC a identifié de nouveaux sites de fixation du Xénon au sein du pore du récepteur, réminiscent des sites de liaison du bromoforme chez GLIC et du Xénon chez ELIC. La localisation de molécules dont l'impact fonctionnel est inhibiteur, au sein du canal des récepteurs ne permet pas de les étudier en tant que modulateurs, mais de les considérer plutôt comme des bloquants du canal (Hilf and Dutzler, 2008; Sauguet et al., 2016).

6.3 Lipides

Il est connu que les protéines membranaires sont sensibles à leur environnement lipidique, tant pour leur intégrité structurale que pour leur fonction, et les RCPs ne font pas exception à la règle. Certaines études proposent que l'agrégation des nAChRs à la membrane post-synaptique est en partie due à la présence d'îlots lipidiques, notamment riches en

cholestérol ; néanmoins ces hypothèses ont rarement été confirmées *in vitro* (Barrantes, 2014; Oyola-Cintrón et al., 2015). Toutefois, de nombreuses études ont démontré la sensibilité du nAChR à la présence de lipides anioniques et de cholestérol, leur présence combinée étant critique pour la fonction de ces récepteurs. En effet, leur absence entraîne la stabilisation d'une conformation dite « découplée », dans laquelle les récepteurs sont réfractaires à l'activation (daCosta et al., 2013; Martinez et al., 2002). Ces observations ont été complétées d'études computationnelles de docking et de dynamique moléculaire, proposant l'existence de sites multiples de liaisons du cholestérol au sein du TMD, notamment au cœur de chaque sous-unité. Il est proposé que le rôle du cholestérol est de maintenir, ou favoriser, les interactions entre hélices au sein du TMD ou avec de l'ECD, afin de stabiliser la conformation active du récepteur (Brannigan et al., 2008).

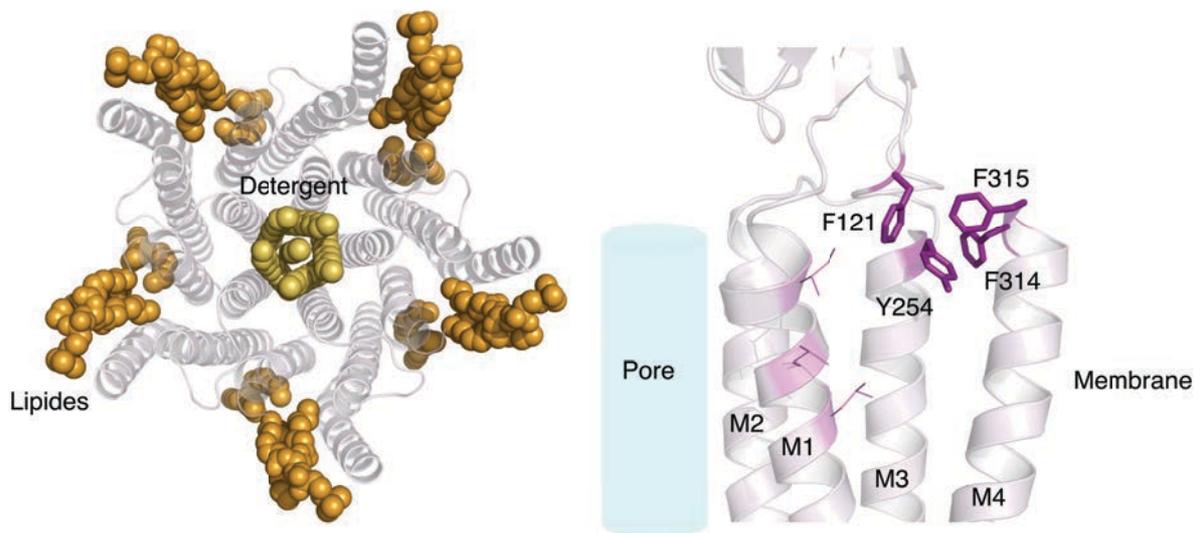


Figure 6.3 : Lipides co-purifiés avec GLIC. La figure de gauche représente une vue du dessus du TMD de GLIC_{pH4} avec, en représentation sphère, les lipides co-purifiés avec GLIC (orange) et cinq molécules de détergents visualisés dans le pore (jaune). La figure de droite est une vue de côté d'une sous-unité de GLIC avec une représentation en bâtons des résidus aromatiques participant à la stabilisation du TMD. En représentation « lignes » sont indiqués des résidus (isoleucine et leucines) qui sont en contact avec les lipides de GLIC (non représentés dans cette vue pour plus de clarté).

La présence de lipides co-purifiés avec GLIC et leur visualisation dans les structures obtenues par cristallographie laisse à penser que les lipides ont également un rôle essentiel chez ce récepteur procaryote (Bocquet et al., 2009). Depuis cette première observation, différentes études ont cherché à caractériser les effets des lipides sur GLIC. Contre toute attente, ces études ont montré que GLIC n'adopte pas de conformation découplée, à l'inverse du récepteur nAChR, et qu'il est fonctionnel lorsque reconstitué dans divers environnement lipidiques, notamment en l'absence de cholestérol et de lipides anioniques (Dellisanti et al., 2013a; Labriola et al., 2013; Velisetty and Chakrapani, 2012b). De plus, une analyse par mutagenèse identifie un cluster de résidus aromatiques à l'interface entre les hélices M4 et M1-M3 comme participant à la stabilisation du TMD et ainsi la robustesse de la fonction de GLIC dans différents environnements lipidiques (Carswell et al., 2015; Hénault et al., 2015).

6.4 Bloquants du canal

Les bloquants du canal sont une classe de molécules dont le site de liaison se situe à l'intérieur du pore des récepteurs, empêchant ainsi le passage d'ions à travers la membrane. Ils sont peu spécifiques au sein des RCPs et ont un effet similaire sur beaucoup de récepteurs de la superfamille. Certains sont décrits comme stabilisant l'état actif des récepteurs.

Ils représentent une large classe de molécules aux tailles diverses comprenant notamment la lidocaïne, les dérivés tetra-amonium (TEA, TBA), la picrotoxine et les ions métalliques chargés positivement.

Une étude extensive de co-cristallisation de GLIC en présence de divers bloquants a permis d'établir que, selon leur taille et leur charge, leurs sites s'étendent le long du pore allant des résidus 13'-9' pour la lidocaïne, au filtre de sélectivité en -2' dans le cas des ions métalliques (Hilf et al., 2010; Sauguet et al., 2013c). Une étude de l'homologue bactérien ELIC cristallisé en présence de mémantine, un composé utilisé dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, identifie son site de liaison en haut

du pore, au niveau des résidus 16' (Ulens et al., 2014). La cristallisation du récepteur GluCl en présence de picrotoxine a permis quant à elle de localiser son site de liaison au niveau du pore entre les résidus 2' et -2' (Hibbs and Gouaux, 2011).

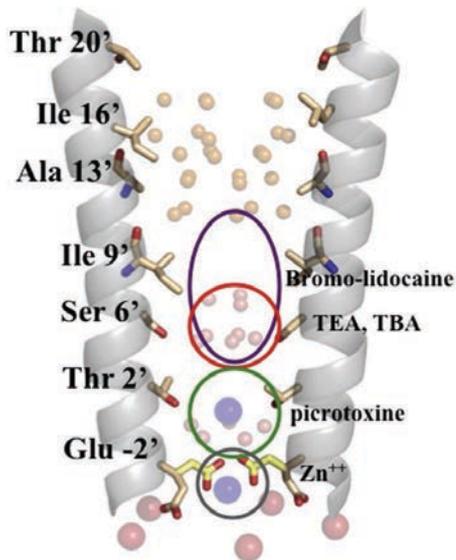


Figure 6.4 : Bloquants du canal. Structure du pore de GLIC en présence de cations (bleu), d'anions (rouge), de molécule d'eau (rouge et orange). Les localisations des autres bloquants du canal sont représentées par des cercles. Figure tirée de (Sauguet et al., 2015) .

Les bloquants du canal ayant une localisation très diverse le long du pore des RCPs, ils pourraient être considérés comme de simples barrages physiques empêchant le passage d'ions à travers le pore. Néanmoins, une récente étude des récepteurs GABA_A et glycine a montré que la liaison de picrotoxine dans le pore était incompatible avec la transition vers l'état désensibilisé. Ainsi, lorsque les récepteurs sont en présence d'agoniste, la population de récepteurs s'équilibre rapidement entre l'état actif et l'état désensibilisé, et l'application de picrotoxine, toujours en présence d'agoniste, permet de déplacer cet équilibre en recrutant les récepteurs désensibilisés vers l'état actif (Gielen et al., 2015). Cette étude apporte un intérêt nouveau à cette classe de molécules, faisant d'eux des agents pharmacologiques précieux dans l'étude des états actifs et désensibilisés.

6.5 Ions divalents et acide cafféique

GLIC n'étant pas activé par un ligand traditionnel, différents travaux ont visés à identifier de novo des effecteurs allostériques du récepteur. Ces

travaux ont permis de décrire un nouvel inhibiteur de GLIC, l'acide caféique, dont le site de liaison est situé dans l'ECD, à l'interface entre sous-unités, au niveau de la boucle C, c'est à dire dans une région équivalente au site orthostérique des autres membres de la famille (Prevost et al., 2013a).

Le Ca^{2+} et le Zn^{2+} sont des modulateurs de la fonction des RCPs et sont suspectés avoir un rôle physiologique important. Ces ions ont des effets différents selon leur concentration et la sous-famille de récepteurs, ou encore l'organisation des sous-unités au sein de ces récepteurs, laissant supposer l'existence de différents sites de liaisons pour ces molécules (Taly et al., 2009). En effet, une étude de mutagenèse réalisée sur le récepteur nicotinique $\alpha 7$ a identifié le site de liaison du Ca^{2+} en haut de la boucle F mais dans un site distinct du site orthostérique (Galzi et al., 1996). De plus, la co-cristallisation du récepteur ELIC en présence d'ions divalent montre un second site de liaison du baryum (qui peut être pris comme équivalent au Ca^{2+}) à l'interface entre les sous-unité sous la poche orthostérique. L'ion Zn^{2+} , outre un site de liaison identifié au niveau du filtre de sélectivité, peut se lier au sein du vestibule de la protéine, à mi-hauteur de l'ECD, mais des études de mutagenèse ont également identifié un site à l'interface entre les sous-unités, toujours au sein de l'ECD (Laube et al., 1995; Zimmermann et al., 2012). Ainsi, la multitude de sites identifiés dans la liaison de ces ions ne permet par encore d'établir un mécanisme clair de leur action, et des expériences futures permettront sans nul doute de clarifier ces questions (Sauguet et al., 2015).

7. Etudes dynamiques des transitions allostériques des RCPs

Les structures obtenues par cristallographie et par microscopie électronique permettent d'établir des modèles de transitions allostériques à l'échelle atomique. Néanmoins, ces structures ont été obtenues sur des protéines extraites des membranes en détergent et, dans le cas de la cristallographie, piégées au sein d'une maille cristalline. De plus, dans le cas des récepteurs GLIC et ELIC, deux études ont montré que la cristallisation sélectionne des conformations particulières des récepteurs (Gonzalez-Gutierrez et al., 2012; Nury et al., 2011). Or, les récepteurs-canaux étant des protéines dynamiques, en constant équilibre entre plusieurs états, on peut se demander dans quelle mesure ces modèles structuraux représentent des transitions entre états existants à la membrane plasmique, effectuées par des récepteurs libres de leurs mouvements. Les études de la dynamique des RCPs, en dehors du cristal, sont donc critiques pour la compréhension des transitions allostériques.

Dans cette partie, trois approches, computationnelles et expérimentales seront abordées. La technique de voltage-clamp fluorométrie, également utilisée pour l'étude de la dynamique des RCPs, sera traitée dans la partie suivante.

7.1 Etudes par résonance magnétique nucléaire

L'utilisation de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour la détermination de structures des RCPs a surtout été utilisée par le laboratoire de Pei Tang et ses collaborateurs.

Les récepteurs-canaux étant de larges protéines pentamériques, dont la taille minimum s'élève à 200kDa, il n'est pas possible à ce jour d'utiliser la RMN du liquide pour étudier leurs structures entières. Néanmoins, les RCPs ayant une architecture modulaire, il est possible d'étudier leurs

domaines séparément. Ainsi, les travaux de P. Tang ont permis d'obtenir la structure de domaines isolés des RCPs eucaryotes : le domaine transmembranaire des récepteurs humains $\alpha 1$ -GlyR, $\alpha 4\beta 2$ -nAChR et $\alpha 7$ -nAChR (Bondarenko et al., 2012, 2010; D. D. Mowrey et al., 2013) et une autre étude a permis l'étude de l'ECD de GLIC (Chasapis et al., 2011).

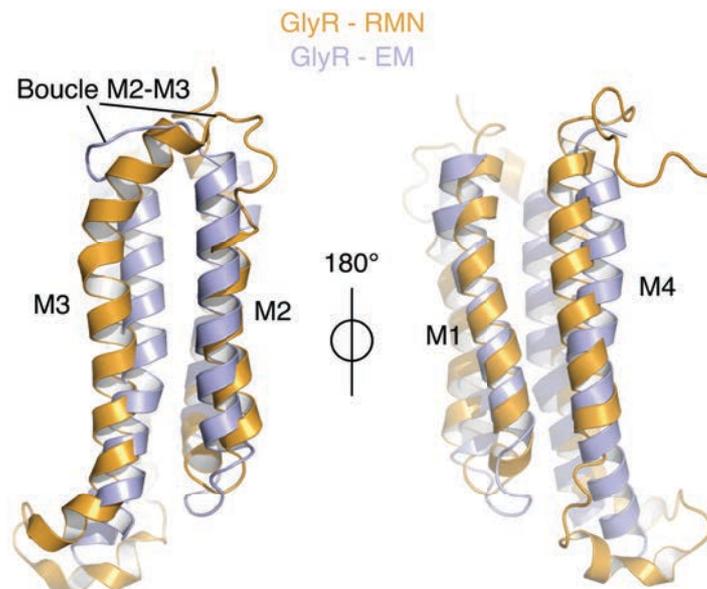


Figure 7.1 : Comparaison de structures obtenues par RMN ou EM du récepteur $\alpha 1$ -GlyR. La figure montre une sous-unité sur laquelle les deux structures ont été alignées, selon deux angles de vue différents. La structure obtenue par microscopie électronique est en violet, celle obtenue par RMN en orange.

Cependant, l'étude de domaines isolés doit être considérée avec précaution. Il a été montré que les TMD des protéines étudiées facilitent le passage d'ions à travers la membrane et maintiennent la propriété de lier les bloquants du canal (D. D. Mowrey et al., 2013). Toutefois, le TMD n'effectuant plus d'interaction avec l'ECD, on peut se demander à quel point la structure d'un TMD seul est représentative d'un TMD lié au reste de la protéine. Lorsqu'on aligne la structure du TMD du $\alpha 1$ -GlyR obtenu par RMN au TMD de $\alpha 1$ -GlyR obtenu par microscopie électronique (récepteur entier), on peut voir de très grandes différences au niveau des hélices M2 et M3, ainsi que la boucle M2-M3. En effet, l'hélice $M2_{RMN}$ perd partiellement son hélicité, et l'hélice M3 apparaît quant à elle beaucoup

plus longue, se « couchant » sur le haut du TMD, à la place de la boucle M2-M3. La boucle est ainsi déportée vers l'avant, c'est à dire vers le pore du récepteur. Par ailleurs, l'étude des différentes structures cristallographiques et obtenues par cryo-microscopie électronique montre une grande conservation structurale au sein du TMD entre les différents récepteurs, et au delà des variations propres à chaque état, notamment dans la taille des hélices et les limites définissant la boucle M2-M3. Ainsi, la structure résolue par RMN du domaine transmembranaire du GlyR isolé semble largement artefactuelle.

Notons qu'il existe également quelques études en RMN du solide des RCPs, notamment l'étude de liaison de ligand au sein de la poche orthostérique ou l'étude des interactions de l'hélice M1 avec une bicouche lipidique. Néanmoins, ces études sont encore parcellaires et effectuées sur des régions totalement tronquées du récepteur dans son ensemble, il est donc pour l'instant difficile d'étendre ces conclusions à la famille des RCPs (De Planque et al., 2004).

7.2 Etudes par dynamique moléculaire

Il existe de nombreuses études réalisées sur les RCPs utilisant des méthodes computationnelles. Nombre de ces études se sont intéressées à la liaison de ligand au sein du site orthostérique, ou à la liaison de modulateurs tels que les anesthésiques généraux, mais également aux changements conformationnels globaux ayant lieu dans la transition entre l'état de repos et l'état actif des récepteurs. Cette partie traitant des réorganisations structurales au cours des transitions allostériques, seule la deuxième catégorie d'étude sera abordée.

Les analyses par modes normaux du récepteur nicotinique $\alpha 7$, puis du récepteur GLIC, ont montré qu'une composante importante de la transition repos-actif était décrite par un mouvement de torsion ou « twist » des domaines extracellulaires des récepteurs. L'étude réalisée à partir des structures de GLIC a également décrit la composante de « un-blooming »

de l'ECD, indiquant que cette composante était vue avant le « twist », et pouvait ainsi représenter la première étape de la transition (Bertaccini et al., 2008; Cheng et al., 2006; Sauguet et al., 2014; Taly et al., 2005b).

Des simulations de dynamique moléculaire effectuées sur GLIC et le récepteur GluCl ont également décrit le twist et le un-blooming comme des composantes de la transition repos-actif (Calimet et al., 2013; Nury et al., 2010). Mais ces études ont mis en avant d'autres réorganisations au cours de cette transition, notamment l'importance des brins $\beta 1$ - $\beta 2$ qui commencent en haut du domaine extracellulaire et terminent au dessus le l'hélice M2 du pore, formant la boucle 2. Les simulations réalisées permettent de proposer que la boucle 2 contribue à la communication entre la liaison du ligand et l'ouverture du pore, et remplit le rôle de « stabilisateur » de l'hélice M2, en position ouverte, en interagissant avec la proline 23', située sur la boucle M2-M3. La boucle M2-M3 est quant à elle décrite comme effectuant un mouvement vers l'arrière lors de l'ouverture du pore. Ces prédictions sont en remarquable accord avec les observations faites à partir des structures de GLIC et du GluCl.

Une étude similaire effectuée sur le récepteur procaryote ELIC indique également que ce récepteur effectue un twist au niveau de son ECD lors de l'activation. Par contre, les résultats de cette étude n'indiquent pas de corrélation entre les mouvements de la boucle 2 et les hélices M2, et plus encore, le canal du récepteur n'est jamais ouvert, le diamètre minimum du pore ne s'élargissant pas à plus de $\sim 1,4\text{\AA}$ tout au long de la simulation. Cette « incapacité » du pore à s'ouvrir rappelle les structures obtenues d'ELIC par cristallographie qui montrent systématiquement un pore fermé quelque soit le ligand présent avec le récepteur (Cheng et al., 2009). Notons que ces observations sont paradoxales, l'activation du récepteur ELIC donnant bien lieu à des courants à la membrane (Zimmermann and Dutzler, 2011).

Les simulations faites sur GLIC et GluCl sont en réalité décrites depuis l'état actif vers l'état de repos, dans les deux cas les molécules agonistes

(le proton pour GLIC et l'ivermectine pour le GluCl) sont retirées instantanément du milieu et les simulations représentent ainsi la transition de désactivation des récepteurs. Dans le cas de GLIC, la fermeture des hélices est asymétrique et réalisée avant les mouvements de twist global. Notons que les mouvements au sein de l'ECD sont eux aussi asymétriques (Nury et al., 2010). A l'inverse, les simulations réalisées sur le récepteur GluCl après avoir enlevé l'ivermectine montrent d'abord un twist global, suivi du mouvement de la boucle M2-M3 et enfin, la fermeture du pore par le mouvement des hélices M2 (Calimet et al., 2013).

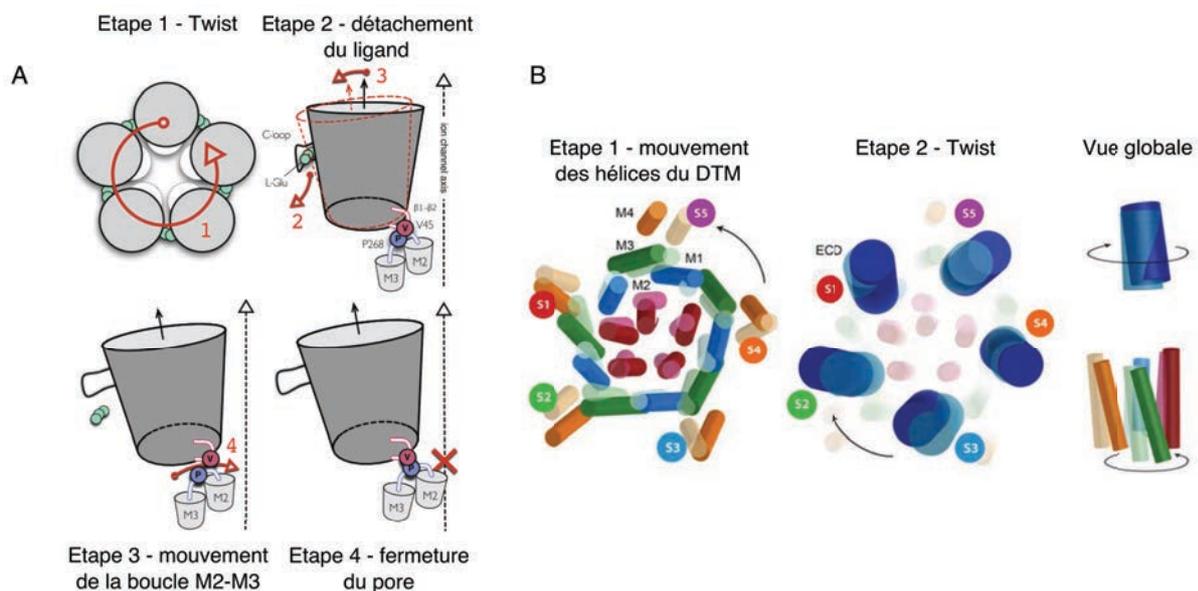


Figure 7.2 : Présentation des deux modèles de transitions établis par dynamique moléculaire. A : Modèle proposé par Calimet *et al.* sur le récepteur GluCl représentant la transition de désactivation du récepteur, après retrait de l'ivermectine (située dans le TMD) mais en laissant le glutamate (lié au sein de la poche orthostérique). B : Modèle proposé par Nury *et al.* sur le récepteur GLIC après retrait du proton (passage de pH4 à pH7). Les hélices et sandwichs β sont représentés par des cylindres, en couleur pleine dans leur conformation finale et en couleur transparente dans leur conformation initiale. Au sein du TMD les hélices sont colorées comme suit : M1 en bleu, M2 en rouge, M3 en vert et M4 en orange. (Calimet et al., 2013; Nury et al., 2010).

Différents travaux ont également été effectués afin d'élucider le « chemin » de transmission de l'information entre la liaison d'une molécule d'agoniste au sein de l'ECD et l'ouverture du pore au sein du TMD. En utilisant la technique de « Perturbation-based Markovian

Transmission » (PMT) Mowrey *et al.* proposent que l'information entre ces deux sites peut-être transmise par différents « chemins », mais préférentiellement à travers la boucle 2 ou alternativement par le pré-M1, région qui lie l'ECD au TMD. Les auteurs notent également que la transmission du signal via la boucle 2 peut se faire au sein de la même sous-unité ou entre deux sous-unités adjacentes, alors que la transmission via le pré-M1 n'est visible qu'entre deux sous-unités (D. Mowrey *et al.*, 2013). Notons que la notion de chemin de transmission du signal est difficile à réconcilier avec les conclusions des analyses REFER présentées dans la partie 3.3. Ces dernières proposent en effet que différentes régions se réorganisent dans leur conformation active indépendamment les unes des autres.

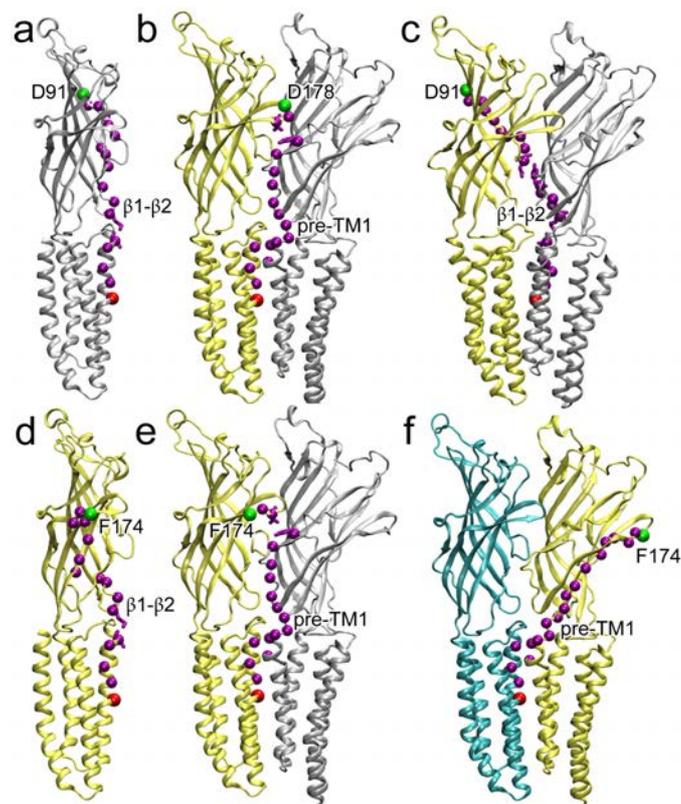


Figure 7.3 : chemin de transmission du signal entre la liaison de l'agoniste et l'ouverture du pore. Six structures sont représentées montrant chacune un chemin possible suivant la perturbation initiale (sphère verte) située soit sur la boucle C (mutations F174 et D178, chemins b, d, e, f) soit sur le feuillet β (mutation D91, chemins a et c) tous deux localisés sur des structures formant la poche orthostérique. Extrait de (D. Mowrey *et al.*, 2013).

7.3 Etudes par résonance paramagnétique électronique

L'utilisation de la résonance paramagnétique électronique (RPE) implique la liaison d'une sonde radicalaire, c'est-à-dire portant un électron non apparié qui sera sensible à son environnement. Le plus souvent la sonde est introduite par réaction covalente sur une cystéine, elle-même introduite dans une ou plusieurs régions de la protéine. La sonde agit ainsi comme rapporteur de l'environnement et permet de suivre des réorganisations structurales lors de transitions entre états.

Cette méthode a été largement utilisée pour l'étude des transitions allostériques de GLIC reconstitué en liposomes (Chakrapani, 2015; Dellisanti et al., 2013b; Velisetty and Chakrapani, 2012b; Velisetty et al., 2014, 2012a). Les mesures de RPE étant effectuées à l'équilibre, où les protéines sont en présence d'agoniste pendant parfois plusieurs heures, cette technique ne permet pas d'avoir accès aux états transitoires, tels que l'état actif si l'on admet que GLIC désensibilise, et a fortiori, les intermédiaires de transition. Ainsi, les études de RPE effectuées sur GLIC ont été interprétées dans le cadre de réorganisations structurales entre l'état de repos et l'état désensibilisé. Notons d'ailleurs que dans leurs études, Velisetty *et al.* affirment que GLIC reconstitué en liposomes ne peut être activé aux concentrations de proton typiquement utilisées en cellules, mais à des pH très acides avec un $pH_{50}=2,90$ (Velisetty and Chakrapani, 2012b); ils notent également que certaines des sondes radicalaires utilisées sont instables à ces faibles pHs, les résultats de ces analyses doivent donc être interprétés avec précaution (Velisetty et al., 2014).

Au niveau de l'ECD, ces études montrent que, lors de la transition de désensibilisation, les résidus situés sur le corps de la boucle C (encadrant la poche orthostérique du côté externe de la protéine) et les résidus de la boucle $\beta 4$ - $\beta 5$ (côté vestibule) perdent en mobilité. De même, ils voient que les résidus de la pointe de la boucle C restent immobiles dans les deux conformations (Velisetty and Chakrapani, 2012b). Les auteurs concluent

de ces mesures un mouvement des sous-unités vers l'intérieur de la protéine. Ces mouvements apparaissent également compatibles avec le modèle de transition repos-actif décrit à partir des structures cristallographiques, qui propose une contraction de l'interface entre sous-unités, la pointe de la boucle C suivant le mouvement du feuillet de la sous-unité adjacente.

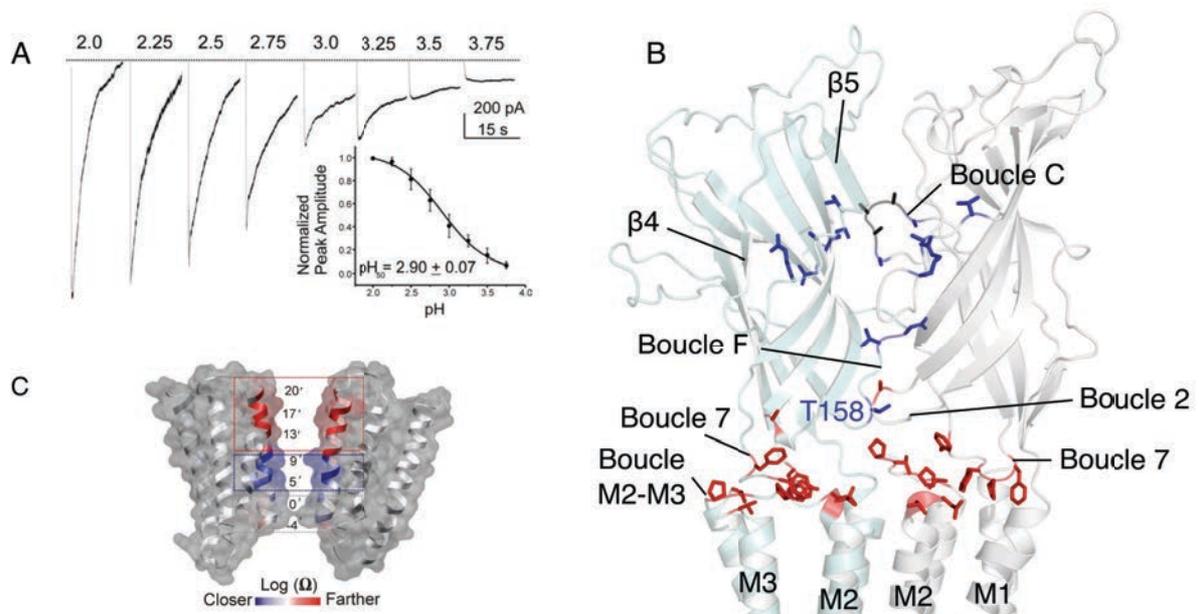


Figure 7.4 : Réorganisations de GLIC en liposomes suivies par RPE. A : Enregistrements électrophysiologiques par patch-clamp en conformation inside-out, de GLIC reconstitué en liposomes. B, C : Structure de GLIC, seules deux sous-unités sont représentées, vues depuis le vestibule et le pore. B : Les résidus perdant en mobilité lors de la transition vers l'état désensibilisé sont colorés en bleu, ceux dont la mobilité ne change pas en noir, et ceux gagnant en mobilité en rouge. Les résidus sont colorés selon les résultats publiés par Velisetty *et al.*. C : Zoom sur le pore de GLIC. Les résidus des hélices M2 sont colorés selon la légende, en rouge lorsqu'ils s'éloignent au cours de la transition vers l'état désensibilisé, et en bleu lorsqu'ils se rapprochent. Figure extraite et inspirée de (Velisetty and Chakrapani, 2012b).

Au niveau de l'interface, ils observent que la boucle M2-M3 est plus mobile et plus en contact avec l'environnement lipidique, ce qui peut s'apparenter à un mouvement vers l'arrière. A l'inverse, la boucle F perd en mobilité dans l'état désensibilisé du récepteur. Il doit être noté que la perte de mobilité de la boucle F publiée par Velisetty et al. est en

apparente contradiction avec une autre étude de GLIC utilisant la RPE qui propose un mouvement de 9,2Å de la position T158, à la pointe de la boucle F (Dellisanti et al., 2013b).

Etonnamment, les données décrivent une augmentation de la flexibilité, dans l'état désensibilisé, de la boucle 7 située juste au dessus du cœur des hélices transmembranaires, et de la boucle 2 située au dessus des hélices M2. Au niveau du pré-M1 et de l'hélice M1 il est difficile d'avoir une vue d'ensemble des données car les positions diffèrent beaucoup dans leur mobilité au sein d'un même état, et sont décrites comme peu accessibles aux marqueurs lipidiques utilisés dans l'étude, ce qui peut paraître surprenant pour une hélice transmembranaire située en bordure du récepteur (Velisetty et al., 2014).

Enfin, au niveau du TMD, l'insertion de sondes au sein des hélices M2 sur des résidus pointant vers le pore indique que le haut du pore s'élargit dans la transition de l'état de repos vers l'état désensibilisé, et le bas du pore se rétrécit, les positions en 9' et 5' de chaque hélice M2 se rapprochant (Velisetty et al., 2012a). Toutefois, les mêmes auteurs publient une étude deux ans plus tard indiquant notamment que certains résidus du haut du pore ne sont pas en contact avec le solvant dans l'état désensibilisé, indiquant une réelle complexité dans l'interprétation des données de RPE. De même ces données ne sont pas tout à fait en accord avec les structures cristallographiques et les études de mutagenèse qui suggèrent que la « porte » d'activation se trouve en position 9' et reste ouverte lors de la désensibilisation, la « porte » de désensibilisation se trouvant en 2'. De plus, la fonction des récepteurs marqués par les sondes de RPE n'a pas été publiée, et il est ainsi possible qu'elles impactent fortement leur fonction, se trouvant au sein du pore.

Ainsi, il est difficile de conclure avec un modèle de transition vers l'état désensibilisé dans le détail des positions étudiées, mais on peut proposer un modèle global impliquant une perte de mobilité de l'ECD, une augmentation de mobilité à l'interface entre l'ECD et le TMD et une conformation du pore ouvert en haut et fermé en bas.

8. La fluorescence dans l'étude des réorganisations structurales des RCPs

La partie suivante décrit certains points théoriques sur la fluorescence et comment ce phénomène physique peut être appliqué à l'étude des transitions allostériques chez les RCPs.

8.1 Aspects théoriques

8.1.1 Définition de la fluorescence

Lors d'une interaction avec de la lumière, l'absorption de photons par une molécule va l'amener dans un état électronique excité. Sa désexcitation peut se faire par différents moyens, dont un est l'émission spontanée de photons, phénomène décrit par le terme luminescence. La luminescence regroupe les phénomènes de phosphorescence et de fluorescence. Les deux ont longtemps été distingués par leurs caractéristiques temporelles, le terme fluorescence regroupant les émissions rapides de photons et la phosphorescence les émissions de photons plus longues (temps de vie de l'état excité court ou long, respectivement). Cependant cette classification n'étant pas exacte, on préférera utiliser le terme phosphorescence lorsque, au cours de sa désexcitation, la molécule passe par un intermédiaire, et la fluorescence lorsque la désexcitation s'effectue sans intermédiaire.

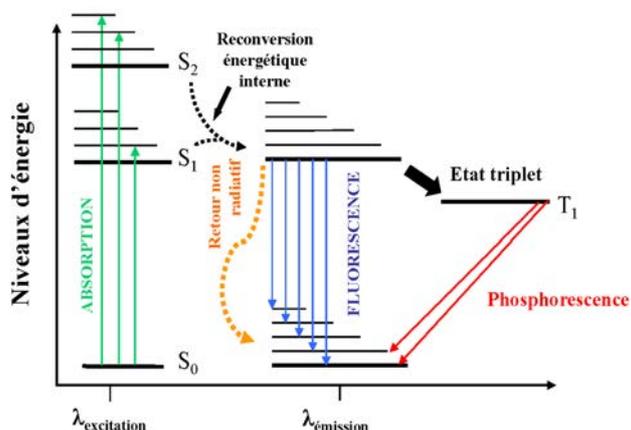


Figure 8.1 : Diagramme de Jablonski.

Le diagramme représente les deux « voies » de désexcitations, fluorescence et phosphorescence, suite à l'absorption de photons par une molécule. La flèche reconversion énergétique interne correspond à la relaxation vibrationnelle de la molécule excitée (sans émission de photon).

Selon sa structure, un fluorophore va absorber la lumière à certaines longueurs d'ondes. La mesure de ces longueurs d'ondes définit ainsi le pic d'excitation de la molécule. On peut voir sur la figure 8.1 que la molécule excitée perd une certaine quantité d'énergie par relaxation vibrationnelle, qui n'implique pas d'émission de photon. Ainsi, le photon émis par la molécule est de plus basse énergie que le photon absorbé, sa longueur d'onde sera donc plus grande. Le pic d'émission d'un fluorophore se situe ainsi à des longueurs d'ondes plus grandes que le pic d'excitation, ce phénomène étant décrit comme « déplacement de Stokes », en honneur du physicien George G. Stokes qui l'a décrit pour la première fois en 1852.

8.1.2 Effets de l'environnement

La fluorescence d'une molécule est très souvent sensible à son environnement, faisant des fluorophores des « rapporteurs » de l'environnement largement utilisés en biologie.

Il existe de nombreux facteurs pouvant avoir un effet sur la fluorescence, dont certains seront détaillés ci-dessous (Figure 8.2):

- Les effets de solvants. Les fluorophores solvatés sont en interaction constante avec les molécules du solvant, celles-ci pouvant plus ou moins stabiliser l'état excité ou basal du fluorophore. Les effets de solvants sont particulièrement complexes à déterminer avec précision car ils regroupent des phénomènes très différents tels que les interactions dipôle-dipôle entre le solvant et le fluorophore, ou la formation de liaisons hydrogènes. De plus, l'utilisation de fluorophores comme senseurs biologiques implique le plus souvent que ceux-ci soient liés à une protéine, et donc au sein d'un environnement pouvant largement affecter la sphère de solvatation du fluorophore, rendant la caractérisation des effets de solvant très difficile. Néanmoins, certaines simplifications sont généralement admises pour l'interprétation des données de fluorescence. Ainsi, au passage dans un environnement plus apolaire, on pourra observer un déplacement vers les basses

longueurs d'onde du spectre d'émission d'un fluorophore (Figure 8.2).

- Les effets de viscosité. Certains fluorophores peuvent effectuer des rotations internes, selon leurs structures. Dans un milieu à basse viscosité, par exemple à haute température, ces mouvements rotationnels peuvent fournir un chemin de désexcitation non-radiatif et ainsi apparaître comme une baisse de fluorescence enregistrée. A l'inverse, dans un environnement à haute viscosité, ou contraint, un fluorophore émettra plus de photons.
- Interactions intermoléculaires. Les interactions intermoléculaires regroupent de nombreux phénomènes généralement décrits sous le terme de « quenching » ou extinction de fluorescence. Un des cas particuliers le plus connu est le quenching dynamique, phénomène par lequel un fluorophore est désexcité par une émission de chaleur suite à une collision avec une autre molécule. Cependant, il existe d'autres phénomènes de quenching incluant la formation de complexes non-fluorescents ou encore le transfert d'électrons ou de photons. Le phénomène de quenching résulte en une diminution de la fluorescence émise par le fluorophore (Figure 8.2).

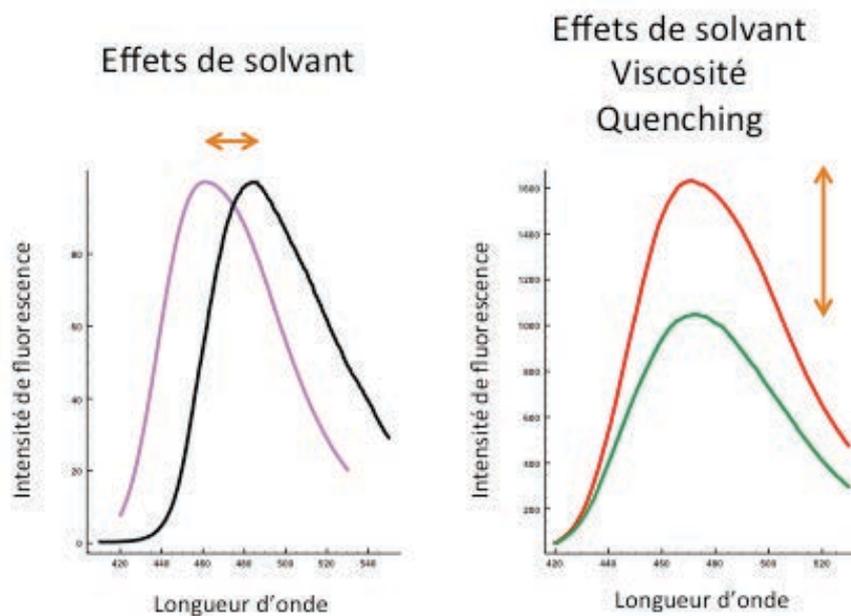


Figure 8.2: Impact de l'environnement sur l'émission de fluorescence. La figure représente des spectres d'émission d'un fluorophore illustrant l'impact de différents facteurs environnementaux sur l'aspect des spectres.

8.2 Utiliser la fluorescence pour l'étude des réorganisations structurales des RCPs

8.2.1 Transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET)

Le transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET) est un cas particulier de désexcitation d'un fluorophore sans émission de photon. Ce phénomène peut être observé entre deux fluorophores si les conditions suivantes sont remplies : 1) Les deux fluorophores effectuent une interaction de type dipôle-dipôle. 2) Leurs spectres d'émission (donneur) et d'excitation (accepteur) doivent se recouvrir, c'est à dire que les deux molécules ont des transitions vibroniques de même énergie, on dit alors que les molécules sont en résonance.

Ainsi, lorsqu'un fluorophore donneur est excité, son électron peut retourner à son niveau de plus basse énergie sans émission de photon si l'énergie accumulée peut être transmise par résonance au fluorophore accepteur, qui sera alors à son tour excité (Figure 8.3).

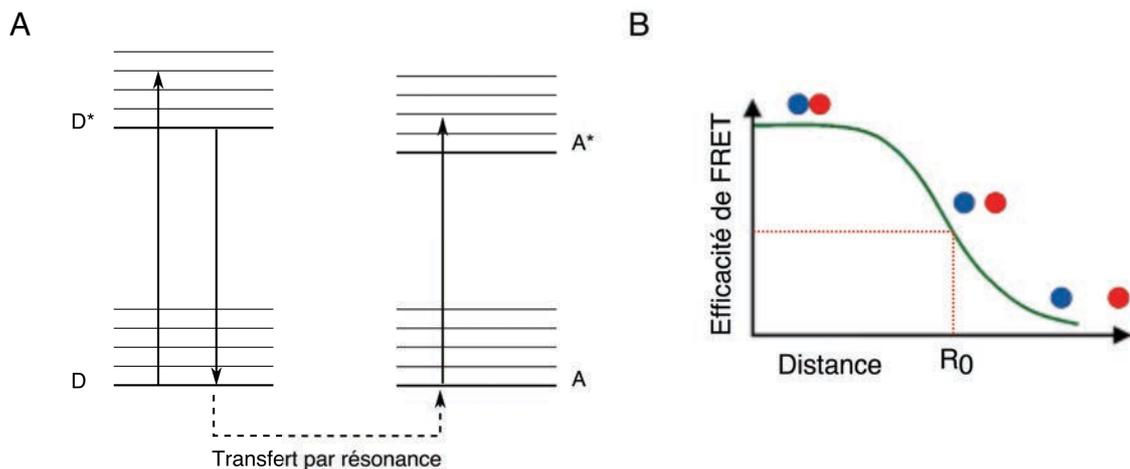


Figure 8.3 : Caractéristiques du FRET. A : Diagramme de Jablonski montrant le transfert d'énergie entre un fluorophore donneur et un fluorophore accepteur, dans le cadre du FRET. B : Relation entre l'efficacité du FRET et la distance entre les deux fluorophores. Les fluorophores sont placés sur la courbe sous forme de sphères colorées en bleu et rouge.

Ce transfert d'énergie montre une dépendance à la distance de r^{-6} (r = distance entre les deux molécules). Ceci implique que l'émission de fluorescence mesurée sur le fluorophore accepteur, ou la diminution de fluorescence du donneur, permet en théorie d'évaluer la distance entre les deux partenaires, faisant de ce phénomène physique une technique très utilisée pour l'étude structurale de protéines.

De nombreux systèmes ont ainsi été caractérisés par cette méthode, pouvant être appliquée à l'étude de protéine à la membrane de cellules, à des études sur protéines purifiées à l'équilibre, ou encore en temps réel (Muretta et al., 2015; Taraska and Zagotta, 2007). Ces mesures ont été largement appliquées aux protéines membranaires, permettant notamment d'observer leurs déplacements au sein de la membrane plasmique, leur proximité à d'autres récepteurs, ou encore, de suivre leurs réorganisations structurales (Akyuz et al., 2015; Doumazane et al., 2013;

Olofsson et al., 2014; Taraska and Zagotta, 2010, 2007; Velisetty and Chakrapani, 2012c).

Néanmoins, comme pour chaque méthode détaillée jusqu'ici, il existe des limites à l'interprétation des données de FRET, dont les deux principales sont :

- Les « approximations » dans le calcul des distances entre les deux molécules.

L'équation permettant le calcul de cette mesure est la suivante:

$$R = R_0 \left(\frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}}$$

$$\text{avec } R_0 = \sqrt[6]{8.79 * 10^{-5} J q_d n^{-4} \kappa^2}$$

$$\text{et } E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D}$$

J : recouvrement du spectre d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur, q_d : rendement quantique du donneur, n : indice de réfraction du milieu, κ^2 : facteur géométrique représentant l'orientation relative des dipôles entre eux, F_{DA} : fluorescence du donneur en présence d'accepteur, F_D : fluorescence du donneur en absence d'accepteur.

Les paramètres de ces équations peuvent tous être déterminés par des études spectroscopiques, à l'exception d'un seul : κ^2 . Comme il est presque impossible de prévoir l'orientation d'un fluorophore au sein d'une protéine, ce paramètre est le plus souvent approximé à 2/3, valeur pour laquelle les molécules ont une rotation libre, cette caractéristique étant très improbable pour un fluorophore lié à une protéine. De plus, le rendement quantique variant avec l'environnement du fluorophore, il peut également être mal-estimé pour un fluorophore au sein d'une protéine.

- La gamme de distance permettant d'observer une différence de FRET.

La relation entre les distances entre fluorophores et l'efficacité de FRET n'est pas linéaire. En effet, pour chaque couple de FRET il existe des distances limites au dessus, et en dessous, desquelles l'efficacité de FRET est soit nulle soit « totale », respectivement (Figure 8.3). La valeur de R_0 (distance pour laquelle il y a 50% d'efficacité) de FRET est dépendante des fluorophores utilisés mais peut varier entre 20 et 70Å.

On a pu voir dans la partie 5.6 que les réorganisations structurales proposées pour les transitions allostériques des RCPs impliquent très souvent des réorganisations locales, avec des Δd inférieurs à 5-10Å, difficilement accessibles par des mesures de FRET. De plus, si le FRET permet de mesurer la distance parcourue lors d'un mouvement, il ne permet pas de caractériser structurellement ce mouvement.

Le développement récent d'un cas particulier de FRET, où la molécule acceptrice est un ion métallique, dénommé « transition metal ion FRET », permet de palier à certaines des limites du FRET classique (Taraska et al., 2009a, 2009b).

Ce cas particulier présente de nombreux avantages, dont :

- La valeur de R_0 est de 10Å, permettant ainsi de suivre localement des petites variations de distances.
- La molécule acceptrice étant un ion, cela permet de s'affranchir en grande partie des problèmes d'approximation d'orientation des sondes.

Toutefois, cette technique nécessite l'insertion de deux histidines assez proches pour former un site de chélation d'un ion métallique afin de le positionner dans la région d'intérêt. Ce point implique une mutagenèse extensive de la protéine et des expériences préliminaires effectuées au sein du laboratoire sur le récepteur GLIC ont montré que ces insertions d'histidines entraînent des problèmes d'expression non négligeables, rendant cette technique difficilement applicable à l'étude des réorganisations structurales des RCPs.

Il serait cependant très intéressant d'utiliser cette technique pour la caractérisation des sites endogènes de fixation d'ions métalliques chez les récepteurs-canaux.

8.2.2 Mesures de quenching, cas particulier du « tryptophan induced quenching » (TriQ)

Le bimane est un petit fluorophore au volume proche d'un noyau indole. Il a été décrit pour la première fois en 1978 par E. Kosower et ses collègues, comme étant un petit fluorophore extrêmement fluorescent et flexible (Kosower et al., 1978). La caractérisation du bimane a été poursuivie et a permis de montrer que sa fluorescence pouvait être éteinte pas les tryptophanes, et dans une moindre mesure les tyrosines, ainsi que lors de collisions avec des ions métalliques, suggérant une extinction de fluorescence par transfert d'électrons (Kosower et al., 1982). Ce n'est qu'en 2002 que les propriétés de ce petit fluorophore ont été réexaminées et la technique du quenching induit par les tryptophanes développée (Mansoor et al., 2002).

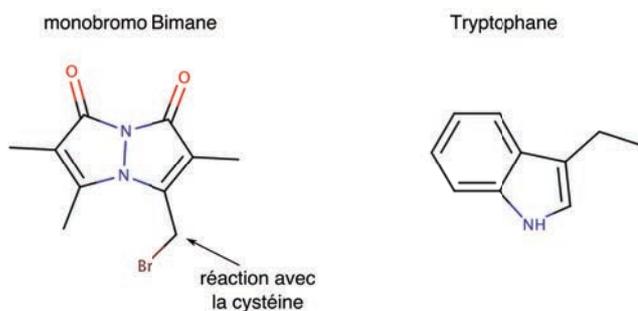


Figure 8.4 : Représentation du bimane. Le bimane le plus souvent utilisé, le monobromo bimane (mBBBr) est représenté à droite, et à gauche est représenté un tryptophane pour comparaison de taille.

Les auteurs de cette étude effectuent une caractérisation systémique des variations de fluorescence du bimane à proximité de tryptophanes, notamment par des études de temps de vie de fluorescence, et concluent qu'un mécanisme de transfert d'électron est le plus probable pour expliquer leurs données. Le quenching du bimane par le tryptophane

s'effectuant uniquement lorsque les deux molécules sont proches, ce transfert d'électron peut être décrit par le mécanisme de Dexter (Figure 8.5). Dans ce cas particulier, la molécule donneuse d'électron, le bimane, transfère son électron excité au tryptophane qui lui, transfère au bimane un électron non-excité. Cet échange est instantané, c'est à dire qu'il n'existe pas d'intermédiaire à cette réaction, et le bimane est ainsi désexcité sans émission de photon. Le corollaire de ce mécanisme est que les orbitales électroniques des deux molécules doivent se recouvrir pour qu'il puisse y avoir un transfert d'électron, ainsi ce phénomène n'est possible que sur des distances de l'ordre de 10\AA , le taux de transfert décroissant exponentiellement avec l'augmentation de la distance.

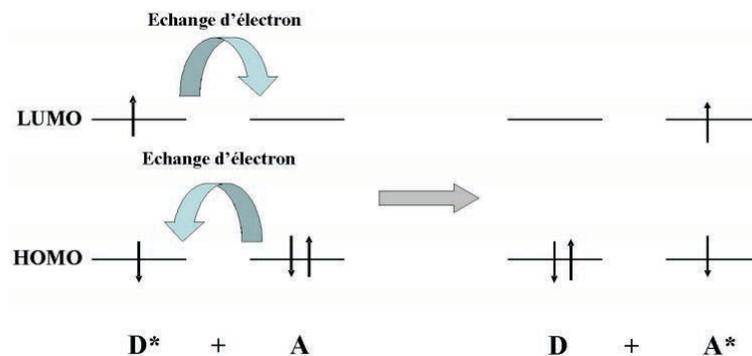


Figure 8.5 : Mécanisme de Dexter.

Ce phénomène physique de transfert d'électron est ainsi également dépendant de la distance entre le fluorophore et le quencher, et permet donc de calculer des variations de distances selon l'efficacité du quenching. De façon identique au FRET, le calcul de cette distance entre les deux sondes est dépendant de leur orientation respective dans l'espace, donnée qui ne peut que très rarement être obtenue expérimentalement.

Toutefois, l'efficacité de transfert ayant une relation exponentielle à la distance, on peut utiliser ces mesures pour des observations semi-quantitatives du mouvement relatif des deux sondes, c'est à dire discriminer entre le rapprochement des sondes et leur éloignement, et ce sur de courtes distances d'interactions ($7\text{\AA} < d > 12\text{\AA}$) (Figure 8.6).

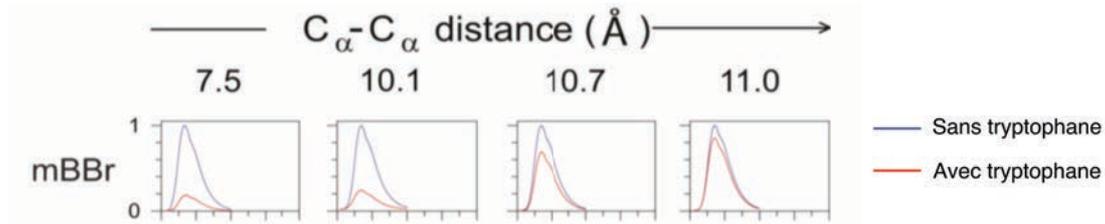


Figure 8.6 : Impact de la distance tryptophane-bimane sur le quenching. La figure représente les enregistrements de fluorescence effectués sur une protéine modèle après réaction avec le bimane, sur laquelle un tryptophane a été inséré à différentes distances du bimane afin de caractériser la distance critique pour l'apparition du quenching (figure tirée Mansoor *et al.*, 2010).

Mansoor et Farrens poursuivent leurs caractérisations en observant que d'autres fluorophores sont également quenchés par le tryptophane, de manière distance-dépendante. Néanmoins, le bimane reste le plus petit fluorophore caractérisé à ce jour par la méthode TrIQ.

Cette méthode a depuis été appliquée à l'étude de différentes protéines, dont les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG) (Islas and Zagotta, 2006), la lactose perméase (LacY) (Smirnova *et al.*, 2014) et le récepteur β -adrénergique couplé aux protéines G (Yao *et al.*, 2006).

Ainsi, cette méthode, utilisant deux fluorophores de petite taille (le bimane et le tryptophane) apparaît comme une alternative intéressante à la voltage-clamp fluorométrie (VCF) (détaillée dans la partie suivante), la probabilité de perturbations structurales induites par la présence d'un bimane étant beaucoup plus faible que celles induites par les gros fluorophores utilisés en VCF. De plus, le quenching n'étant effectif que lorsque un bimane et un tryptophane se trouvent à une distance de 10Å, cette méthode permet de mesurer des variations de distances entre deux régions de la protéine, à une petite échelle et est ainsi plus adaptée aux transitions des RCPs.

8.2.3 Les fluorophores comme senseurs de l'environnement, cas particulier de la voltage-clamp fluorométrie (VCF)

Les acides aminés aromatiques des protéines étant fluorescents, ils ont été utilisés, particulièrement les tryptophanes, pour suivre le repliement des protéines, et les changements conformationnels de celles-ci. Néanmoins, l'utilisation de la fluorescence endogène comme méthode d'étude des RCPs est rendue difficile par le nombre élevé de tryptophanes présents chez ces récepteurs. Dans le cas de GLIC, chaque monomère porte 5 tryptophanes, dont certains ne peuvent être mutés, ce qui implique un récepteur complet portant 25 tryptophanes. Il doit donc être envisagé que chacun puisse subir des changements d'environnements indépendamment des autres, la fluorescence totale n'étant ainsi qu'une moyenne d'effets individuels, impossibles à séparer. Cette utilisation de la fluorescence n'est donc pas indiquée pour l'étude des RCPs et il apparaît préférable d'utiliser des fluorophores exogènes.

La voltage-clamp fluorométrie (VCF) est une technique dont le principe est similaire à la RPE dans le sens où elle implique la liaison sur une protéine d'un fluorophore, capable de rapporter des changements dans son environnement. Dans le cas de la VCF, des récepteurs génétiquement modifiés pour porter une cystéine dans la région d'intérêt sont exprimés à la membrane d'ovocytes de Xénope et marqués par des fluorophores à travers ces cystéines. Cette technique est particulièrement puissante car elle permet d'effectuer des enregistrements de variations de fluorescence simultanément aux enregistrements électrophysiologiques et ainsi de directement relier les réorganisations structurales aux études fonctionnelles de récepteurs.

Néanmoins, afin de pouvoir être détectés à la membrane d'une cellule, les fluorophores utilisés doivent produire un fort signal de fluorescence, et être excités dans la lumière visible, ce qui implique qu'ils soient volumineux.

De cette nécessité expérimentale peuvent découler différents problèmes :
 1) Une sonde trop grosse ne pourra pas forcément atteindre des régions confinées, entraînant ainsi un faible taux de marquage, 2) La liaison de fluorophores volumineux au sein de régions structurellement critiques pour les transitions allostériques peut entraîner de sévères perturbations tant fonctionnelles que structurales, 3) Pour ne pas perturber la structure des récepteurs étudiés ou pouvoir accéder à des régions confinées, les fluorophores sont éloignés du récepteur par une longue « chaîne », rendant toute interprétation structurale des changements de fluorescence difficile, voire impossible (Figure 8.7).

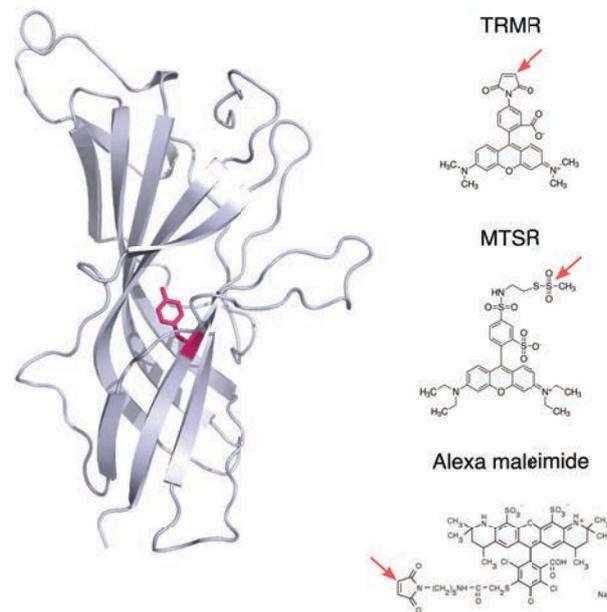


Figure 8.7: Fluorophores utilisés pour la VCF. A gauche est présentée un ECD de GLIC avec une tyrosine en rose, pour comparaison de taille avec les fluorophores. A droite sont représentés les fluorophores le plus couramment utilisés en VCF, mis à l'échelle de la protéine. Les flèches rouges indiquent le groupement réagissant avec la cystéine. Dans le cas de l'alexa, la « chaîne » entre le groupement réactif et le fluorophore est compactée et est en réalité deux fois plus longue.

En d'autres termes, les variations de fluorescence enregistrées par VCF permettent de dire que les récepteurs ont subi une réorganisation structurale, mais ne permettent pas d'interprétation topologique.

Ces réserves sont particulièrement illustrées par la publication de deux études concurrentes marquant le récepteur GABA_A $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ à la même position L127C (boucle E, à proximité de la poche orthostérique), mais avec deux fluorophores différents : dans une étude les auteurs observent des ΔF différents selon qu'ils appliquent un agoniste ou un antagoniste, dans l'autre étude les ΔF sont similaires lors de l'application de ces deux même molécules. Ces résultats pouvant venir d'une interaction directe entre le fluorophore et le ligand, entraînant des changements de fluorescence indépendamment des réorganisations structurales, ou d'une « chaîne » de liaison de taille différente, entre 5 et 15Å dans ce cas (Akk et al., 2011; Muroi et al., 2006).

Ainsi, cette technique est surtout utilisée pour décrire l'effet de différents ligands, ou de différentes sous-unités dans le cas des récepteurs hétéromériques, sur les transitions globales des RCPs, en prenant des précautions particulières sur les conclusions tirées d'études sur la poche orthostérique (Akk and Steinbach, 2011; Pless and Lynch, 2008).

Une étude du récepteur glycine s'est particulièrement intéressée aux effets structuraux impliqués dans l'activation par la glycine en comparaison de l'inactivation par la strychnine. Cette étude montre des changements structuraux au sein du domaine extracellulaire (boucle D et F) similaires en présence de l'une ou l'autre molécule, mais à l'inverse que seule l'activation par la glycine implique des réorganisations au sein du pré-M1 et de la boucle 2 (située au dessus du pore), la strychnine n'ayant pas d'effet à ces positions (Figure 8.8) (Pless and Lynch, 2009a). Ces observations confirment que la structure du GlyR obtenue en présence de strychnine n'est –à priori– pas similaire à un état de repos apo, la strychnine stabilisant un état différent, impliquant des réorganisations au sein de l'ECD.

En poursuivant ce travail par l'étude d'agonistes ayant différentes efficacités, les auteurs montrent que les ΔF enregistrés, et donc à priori les réorganisations structurales, au sein des boucles C et F ainsi que le

pré-M1 et le haut des hélices M2 (positions 19' et 22') sont identiques selon les différents agonistes utilisés. Chez le récepteur GABA_A, des données similaires indiquent qu'un marqueur de la boucle F n'est pas sensible à l'efficacité de l'agoniste. A l'inverse, les variations enregistrées au niveau de la boucle 2, pour le récepteur glycine, montrent une sensibilité à l'efficacité de l'agoniste (Pless and Lynch, 2009b). Les agonistes partiels se différenciant des agonistes totaux par leur capacité à stabiliser l'intermédiaire d'activation FLIP, ces données semblent indiquer un rôle de cette boucle 2 dans la stabilisation de la conformation de pré-activation du récepteur glycine.

Dans le cas de molécules se liant au récepteur dans le TMD, il n'y a pas de variations de fluorescence en haut des hélices M2, indiquant qu'il n'y a pas de mouvement de cette région, lorsque les récepteurs sont en présence d'activateur allostérique (ivermectine) ou potentialisateur (propofol) (Pless et al., 2007). De plus, des études réalisées sur le GABA_A indiquent que l'activation ou la modulation des récepteurs par des ligands du TMD n'implique pas de changement au sein de la poche orthostérique (Akk et al., 2011; Muroi et al., 2006). A l'inverse, l'étude d'un résidu de la boucle M2-M3 (24') montre que cette position effectue des mouvements différents si les récepteurs sont en présence de l'agoniste GABA ou en présence d'effecteurs allostériques se liant au sein du TMD (Muroi et al., 2009). Ainsi, le/les mécanismes par lesquels les effecteurs allostériques de TMD agissent sur l'activation des récepteurs ne sont pas encore clairement établis.

De façon intéressante, les deux récepteurs ne montrent pas de ΔF (ou très faibles au sein de la boucle F), et ce à différentes positions, entre l'activation et la mise en présence de picrotoxine, un bloquant du canal, ce qui soutient l'idée que cette molécule se lie au sein d'une conformation préexistante, stabilisant ainsi l'état actif des récepteurs.

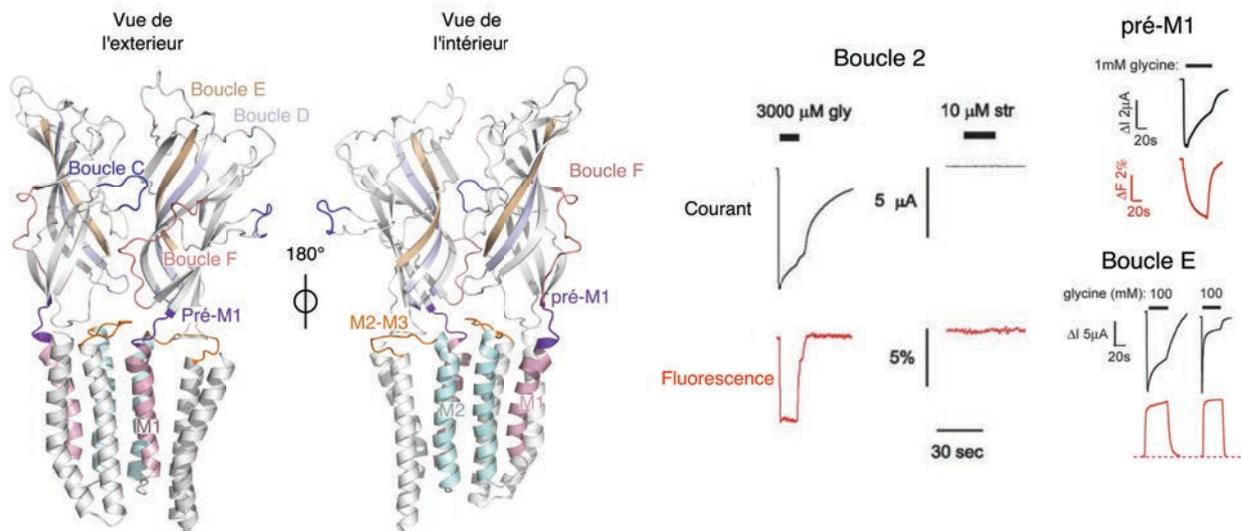


Figure 8.8: Etudes des transitions allostériques par VCF. A gauche : deux sous-unités de GLIC_{pH7} colorées afin d'identifier les différentes régions étudiées par VCF. Bien qu'elles soient des brins β , les régions D et E ont historiquement été catégorisés comme boucles et la terminologie est toujours utilisée par la communauté. A droite : Enregistrements types réalisés par VCF indiquant, en noir les courants enregistrés par électrophysiologie et en rouge les variations de fluorescences enregistrées simultanément. gly : glycine, str : strychnine. Les figures sont tirées des travaux publiés par J.Lynch et ses collaborateurs.

Ces études permettant le suivi direct de la fonction des RCPs parallèlement aux enregistrements de fluorescence, elle est idéale pour étudier la désensibilisation. Des positions suivies au sein de la poche orthostérique et de l'hélice M1 sur le GlyR, et au sein de la poche orthostérique et de la boucle F, sur le GABA_A, ne montrent pas de ΔF lorsque les récepteurs entrent dans la désensibilisation indiquant que ces régions sont de conformations similaires dans l'état actif et dans l'état désensibilisé (Figure 8.8) (Akk et al., 2011; Wang and Lynch, 2011a). Par contre, des positions suivies au sein de la boucle 2 et du pré-M1 montrent des ΔF différents dans l'état désensibilisé et dans l'état actif, indiquant des réorganisations structurales au sein de ces régions lors de la désensibilisation (Wang and Lynch, 2011a).

Ainsi, si l'utilisation de la VCF ne permet pas de décrire structurellement les réorganisations des RCPs, cette technique permet néanmoins

d'identifier les régions effectuant des mouvements selon l'état allostérique ou le composé étudié.

8.3 Problématiques restantes et projet de thèse principal

On a pu voir au cours de cette introduction que les données expérimentales et computationnelles obtenues ces dernières années ont permis de faire un bond en avant dans notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans les transitions allostériques des RCPs.

L'obtention de structures de différents récepteurs, dont des représentants de trois des quatre grandes classes de RCPs, en différentes conformations, a permis d'établir un modèle structural des transitions allostériques à l'échelle atomique, incluant des variations propres à chaque récepteur. Toutefois, ce modèle déduit de structures le plus souvent obtenues sur des récepteurs piégés au sein d'un cristal, et toujours extraits de leur membrane physiologique et solubilisés en détergent, doit être mis à l'épreuve par des expériences dynamiques.

Si les prédictions obtenues par méthodes computationnelles sont parfois en accord général avec les modèles « cristallographiques », il reste des points de débats, notamment car ces prédictions sont réalisées pour la transition de désactivation des récepteurs et non l'activation ou encore la désensibilisation.

De même, les méthodes actuelles de mesure des réorganisations structurales des RCPs en solution ne permettent pas encore une résolution suffisante pour la création d'un modèle structural. En effet, les données obtenues en RPE peuvent souvent être interprétées de différentes façons et ainsi mener à la création de multiples modèles de transitions, peu informatifs et pas assez résolutifs.

De même, les données obtenues par VCF sont très riches pour l'étude, à basse résolution, de l'impact de différents ligands sur les transitions, mais ici encore, ne permettent pas de détailler ces transitions.

De plus, de nombreuses questions restent encore sans réponse. Les structures à haute résolution représentent-elles des états fonctionnels stabilisés à la membrane plasmique ? Les mouvements structuraux du modèle de transition sont-ils indépendants ou corrélés ? Sur quelle échelle de temps et de concentration d'agonistes s'effectuent-ils ? Quelles sont les caractéristiques structurales des intermédiaires d'activation identifiés fonctionnellement ? ...

Mon sujet principal de thèse a eu pour but général d'apporter des réponses à ces questions. Pour cela, j'ai travaillé exclusivement avec le récepteur canal modèle GLIC, pour lequel plusieurs structures sont connues, et qui est particulièrement robuste face aux mutations, tant dans sa fonction que sa structure.

Afin de suivre et caractériser les réorganisations structurales de GLIC au cours de l'activation, j'ai utilisé la fluorescence et plus particulièrement la fluorescence du bimane, sensible à son environnement, en combinaison avec la technique de quenching induit par les tryptophanes. Ces mesures de fluorescence ont été faites sur GLIC solubilisé en détergent, reconstitué en liposomes, à l'équilibre et en temps réel.

IV. Résultats

Ce chapitre s'organise en trois parties, décrivant les trois projets sur lesquels j'ai travaillé au cours de ma thèse.

La première partie regroupe les données obtenues sur mon projet principal : l'étude des réorganisations structurales de GLIC par fluorescence.

La deuxième partie décrit mon travail sur l'identification de la région du préM1/M1 comme charnière pour l'activation et la désensibilisation de GLIC, caractérisée par électrophysiologie et mutagenèse.

Enfin, la troisième partie rassemble mon travail effectué au sein d'une collaboration entre les laboratoires de M. Delarue, A. Blondel et P.J. Corringer sur la découverte de nouveaux agents pharmacologiques chez GLIC ciblant une poche au sein du domaine extracellulaire.

1. Méthodes

Tampons et produits chimiques

Tampon A: 20 mM Tris, 300 mM NaCl, ajusté à pH7.4 sauf indication contraire.

Tampon B: 300 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.3 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, ajusté à pH8 sauf indication contraire. Les deux tampons sont supplémenté par 0.02% de DDM (Anatrace) lorsque cela est spécifié.

Tampon MBS: 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.5 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 0.7 mM CaCl₂, 1 MgSO₄, ajusté à pH7.4.

Tampon MES: 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM MES, ajusté au pH désiré par ajout de HCl 2M.

Tampon de marquage des CHO: 150 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, 0.1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, ajusté à pH7.4.

Tampon de conservation des CHO: 160 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 8 mM glucose, ajusté à pH7.4.

Le Monobromo bime (mBB) (ThermoFisher Scientific) est dissout dans 100% de DMSO à une concentration finale de 10 mM et conservé à -20°C.

Le Bime sel de Bunte (BBs) est dissout à 50 mM dans de l'eau et conservé à -80°C.

Mutagenèse

Toutes les constructions de GLIC ont été obtenues par le kit de mutagenèse molecular probe (ThermoFisher Scientific), et ont été générées sur le récepteur sans cystéines endogènes (C27S). Les constructions ont été réalisées dans deux vecteurs précédemment décrits (Bocquet et al., 2007) et construits comme suit:

- Le vecteur pmt3 est utilisé pour l'expression eucaryote et porte le peptide signal $\alpha 7$ et un tag-HA en position C-terminale de GLIC.
- Le vecteur pet20b est utilisé pour l'expression procaryote et permet l'expression de GLIC fusionné à la MBP en N-terminal.

Production de protéines et marquage fluorescent

MBP-GLIC a été produite comme décrit précédemment (Bocquet et al., 2009), dans la souche *E.Coli* BL21. Brièvement, MBP-GLIC est produite à 20°C dans les bactéries BL21 après induction par l'IPTG (20mM). Après lyse des cellules par sonication les membranes sont séparées par ultracentrifugation (40000 rpm) et GLIC-MBP est extraite dans du tampon A complété de 2% de DDM, sur la nuit à 4°C. MBP-GLIC est purifiée sur une résine amylose et est éluée par ajout de maltose dans du tampon A 0,02% DDM. Les protéines sont de nouveau purifiées par gel filtration superpose 6 10/300 GL (GE Healthcare) afin d'éliminer le contaminant endogène maltoporine. La MBP est ensuite clivée par ajout de thrombine (Merck Millipore) sur la nuit, et GLIC est de nouveau purifié par filtration sur gel. Pour les récepteurs portant les mutation K33C et E243C, les protéines sont incubées avec 10mM DTT pendant une heure avant la filtration sur gel afin de réduire de potentiels ponts disulfure. GLIC est ensuite incubé avec le mBBr (ON, 4°C, sous agitation) à un ratio molaire 1:5 (monomère 1:5 mBBr) tout en s'assurant que la concentration finale de DMSO ne dépasse pas les 0,1%. Le fluorophore n'ayant pas réagi est éliminé par filtration sur gel et la protéine GLIC-mBBr est flash-congelée pour un stockage à -80°C.

Reconstitution en liposomes

De l'asolectine en poudre, extraite de soja (Sigma Aldrich), est solubilisée avec l'aide d'un Potter en tampon B à une concentration de 10mg/ml. La solution est soit utilisée fraîche, soit congelée à -20°C pour des utilisations ultérieures. GLIC est reconstitué en liposomes selon un ratio massique 1:5 (GLIC m:m asolectine). Pour 200 µg de protéine, la procédure suivante a été utilisée, toutes les étapes étant réalisées à température ambiante: 1mg d'asolectine en tampon B est mélangé avec du DDM pour une concentration finale en DDM de 0,7%. La solution est équilibrée pendant 40 minutes à température ambiante afin de solubiliser les liposomes multicouches préformés. 200µg de protéine sont ensuite ajoutés à la solution et le volume final amené à 1ml afin de diminuer la concentration de DDM à 0,2% (1h30, agitation douce). Pour former les protéoliposomes

et pour une inclusion douce de la protéine, le détergent est enlevé par ajouts successifs de Bio-beads (Biorad), pré-activés au méthanol (50mg, 150mg et 300mg). Les bio-beads sont ensuite enlevés par une centrifugation légère et les protéoliposomes sont tout de suite utilisés ou gardés à 4°C pour un maximum de 4 jours.

Enregistrements de fluorescence à l'équilibre

Tous les enregistrements de fluorescence ont été effectués sur un fluoromètre Jasco 8200. Les tampons et échantillons protéiques sont systématiquement équilibrés à température ambiante avant les enregistrements, qui sont réalisés à 20°C. Le mBBr et les échantillons GLIC-mBBr sont excités à 385nm et les spectres d'émission sont enregistrés de 420 à 530nm à travers des fentes de 2nm à l'excitation et l'émission. La vitesse de scan, l'échantillonnage et le PMT sont gardés constants pour tous les enregistrements afin de pouvoir comparer les intensités. Le récepteur GLIC étant activé par le proton, l'insensibilité du mBBr et de son quenching par les tryptophans ont été vérifiés sur une gamme de pH allant pH8 à pH3. Toutes les mesures présentées dans l'étude ont été effectuées sur un échantillon protéique de 1ml dans des cuvettes jetables de 2,5ml transparentes aux UV (Sigma). Les petits volumes utilisés ne permettent pas l'ajout, afin de faire baisser le pH, d'acide concentré, ou dilué, sans que les concentrations ioniques ne soient trop modifiées. Ainsi, les mesures ont été faites après mélange d'un volume de protéine en tampon A 0,02% DDM et un volume de tampon B 0,02% ajusté afin que le pH après mélange atteigne la valeur désirée. La même procédure de mélange de tampons a été utilisée pour les enregistrements de protéoliposomes. Pour chaque mesure, la fluorescence est stable sur plusieurs enregistrements, ne montrant pas de signe de bleaching du fluorophore. Pour chaque pH testé, un spectre d'émission du tryptophane (excitation à 280nm) a été enregistré afin de s'assurer que les protéines n'étaient pas dénaturées, et toutes les variations de fluorescence sont réversibles après retour à pH7.

Enregistrements de fluorescence par stopped-flow

Les enregistrements ont été effectués sur un stopped-flow SFM-300 (BioLogic Science Instruments). Afin de s'assurer de travailler avec une lampe et une température stables, l'appareil est allumé et équilibré à 20°C au minimum 1h avant les enregistrements. L'excitation a été fixée à 385nm à travers une fente de 8nm et la fluorescence à l'émission est enregistrée à travers un filtre coupe-bas à 420nm. Un système d'injection à deux seringues a été utilisé, avec une seringue contenant l'échantillon protéique en tampon B et l'autre seringue contenant du tampon B équilibré de telle façon que le pH final après mélange soit à la valeur désirée. Le volume d'injection a été fixé à 150µl pour chaque seringue avec une vitesse d'injection de 8,7ml/s (vitesse totale de 17,4ml/s) résultant en un temps mort de mélange de 2,1 ms. Trois temps d'échantillonnages ont été utilisés pour chaque enregistrement: 500ms avec un échantillonnage de 100µs, 1 sec / 1ms et 30s / 50ms. Les données de fluorescence des trois premières ms étant extrêmement variables, elles ont été exclues de l'analyse, donnant un total de 5,1ms de données "non-analysées" (3ms + 2,1 ms de temps mort). Les données ont été analysées sur Datagraph et ajustées à une équation multi exponentielle, en ne dépassant pas trois exponentielles:

$$y(x) = F + (F1 * \exp(-k1 * x) + F2 * \exp(-k2 * x) + F3 * \exp(-k3 * x))$$

Avec F: intensité de fluorescence après 30s, F1,2,3: variation de fluorescence d'une phase exponentielle particulière, et k1,2,3: constante cinétique de chaque exponentielle en s⁻¹. Le bruit de fond en fluorescence venant du tampon a été systématiquement enregistré et soustrait aux données. Pour chaque condition, une moyenne de 10 traces a été comptée comme un essai et toutes les conditions ont été enregistrées sur au moins 3 essais. Chaque ajustement aux exponentielles a été fait indépendamment pour chaque essai.

Culture, transfection et marquage des CHO

Les cellules "Chinese hamster ovary" (CHO) ont été cultivées dans du milieu Ham's F-12K Kaighn's modification (ThermoFisher Scientific)

complémenté par du sérum de veau foetal (10%) et contenant de la pénicilline (100 U/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml).

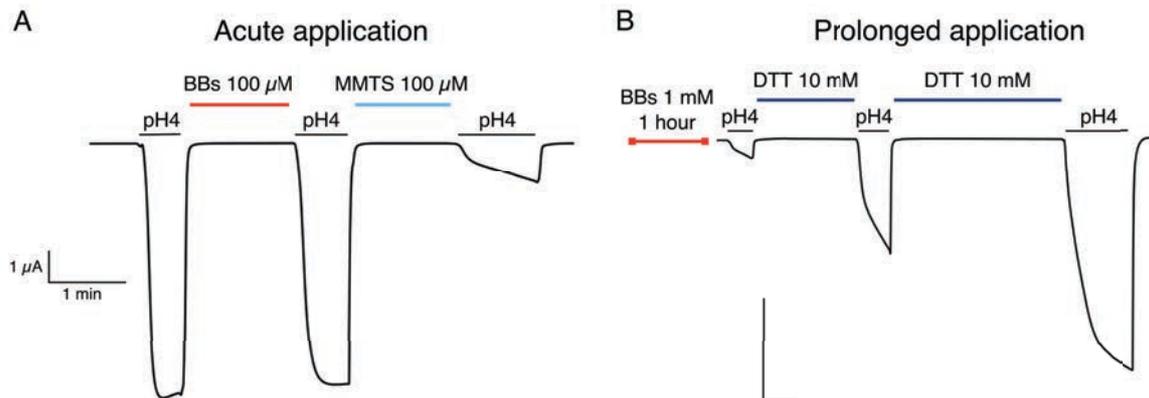
Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de polystyrène de diamètre 35 (Falcon) et ont été transfectées par le cDNA de GLIC et de la mCherry, utilisée comme contrôle de transfection, selon les instructions du kit JetPRIME (Polyplus Transfection). Les cellules ont ensuite été cultivées pendant 48-72h pour assurer une expression robuste.

Pour toute la procédure de marquage, les cellules sont gardées à 4°C afin d'éviter une endocytose du fluorophore. Pour le marquage au BBs, les cellules sont rincées trois fois (5-10min, agitation douce) en tampon de marquage, puis elles sont incubées pendant 1h avec du BBS 1mM en tampon de marquage. Les cellules sont ensuite rincées deux fois dans le tampon de marquage (5-10, agitation douce) et conservées dans le tampon de conservation à température ambiante pendant toute la durée de l'imagerie.

Enregistrements électrophysiologiques

Les enregistrements fonctionnels ont été réalisés sur des ovocytes de *Xénope* fournis par le Centre de Ressources Biologiques Xénopes–Rennes. Tous les enregistrements ont été effectués comme précédemment décrit (Duret et al., 2011) après 48-96h d'expression et avec la seule différence que les ovocytes ont été clampés à -40mV. Les données ont été analysées sur AxoGraph X. Pour les enregistrements après réaction avec le BBs, les ovocytes ont été incubés pendant 1h en présence de 1mM BBs, à température ambiante et sous une faible agitation. Les mutants de GLIC portant les mutations K33C et E243C sont préalablement traités avec 10mM DTT. Après marquage, les ovocytes sont rincés au MBS et enregistrés dans l'heure. Pour tous les mutants, les courants ont été enregistrés sur des ovocytes non marqués, suivit par un marquage au BBs et de nouveaux enregistrements. Indépendamment, des ovocytes non préalablement enregistrés ont été marqués et leur courants mesurés après marquage. Les enregistrements obtenus par les deux protocoles donnent des courants similaires, ainsi les données fonctionnelles indiquées pour chaque mutant sont une moyenne de ces

deux types d'enregistrements. Dans le cas du mutant P250C-Y197F, seul le deuxième protocole a été utilisé, les mutants montrant un run-down trop important pour pouvoir être enregistrés plusieurs fois. Les mutants générant un courant inférieur à 500nA à la membrane ont été classifiés comme non-fonctionnels.



Marquage de GLIC à la membrane d'ovocytes. A, B: Traces d'électrophysiologie obtenue pour le mutant Q193C. A: La trace montre une inhibition de GLIC Q193C après réaction avec le MMTS mais non le BBs lors de perfusions rapides. B: La trace montre une inhibition effective du mutant Q193C après réaction avec le BBs suite à une incubation d'une heure. L'inhibition est progressivement reversée par le traitement des ovocytes au DTT.

Immunofluorescence sur ovocytes

Les ovocytes exprimant la construction d'intérêt (48h-96h d'expression) sont placés dans une solution fixatrice à 4% de PFA (paraformaldéhyde) (16h, 4°C) puis rincés extensivement dans du PBS (phosphate buffer saline). Ils sont ensuite incubés dans du PBS + 10% sérum de cheval (30min, RT) afin de bloquer les sites aspécifiques de fixation, puis rincés deux fois dans du PBS + 2% de sérum. Après rinçage les ovocytes sont incubés avec l'anticorps primaire antiHA rabbit (Sigma) dilué au 1/200 dans du PBS + 2% de sérum (1h30, RT), puis rincés deux fois dans du PBS + 2% de sérum, et enfin ils sont incubés avec l'anticorps secondaire anti rabbit Alexa645 dilué au 1/1000 dans du PBS + 2% de sérum (1h, RT) puis rincés deux fois dans du PBS + 2% de sérum. Les ovocytes marqués sont de nouveau fixés dans une solution de PFA 4% (16h, 4°C). Ils sont ensuite immobilisés dans un cube d'agarose 3% puis découpés au

vibratome en tranches d'épaisseur de 40µm. Les coupes sont montées sur lames avec le milieu ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) puis stockées à 4°C pendant 24h avant observation.

Analyse de la désensibilisation

Les tracés électrophysiologiques obtenus ont été ajustés à une équation mono-exponentielle, sur la durée de la désensibilisation :

$$f(t) = A * e^{\frac{-t}{\tau}} + C$$

avec A : amplitude de l'exponentielle, C : courant restant à la fin de l'exponentielle et τ : constante de temps de la désensibilisation.

Dans le cas du mutant P250C-Y197F, les données sont mieux analysées par une double exponentielle :

$$f(t) = A_1 * e^{\frac{-t}{\tau_1}} + A_2 * e^{\frac{-t}{\tau_2}} + C$$

Les expériences de microscopie confocale, cristallographie et synthèse du BBs ont été réalisées en collaboration, ou entièrement réalisées, par N. Rebola, Z. Fourati, E. Drège et D. Joseph. Ainsi, les méthodes particulières développées pour ces techniques n'étant pas le fruit de mon travail, elles sont présentées au sein de l'article principal de ma thèse, en annexe.

2. Projet 1 : Etude des réorganisations structurales de GLIC par fluorescence

2.1 Préface

Ce travail a été le fruit de plusieurs collaborations : la résolution de la structure de GLIC en présence de bimane a été effectuée par Zeineb Fourati au sein du laboratoire de Marc Delarue à l'institut Pasteur. Delphine Joseph et Emmanuelle Drège, au sein de l'équipe de Chimie des Substances Naturelles à l'université Paris-Saclay, ont proposé et synthétisé le nouveau dérivé du bimane utilisé dans cette étude. Et je tiens également à noter la participation de Solène Lefebvre à ce travail qui a, pendant son stage de M2 au sein de notre laboratoire, travaillé au développement du protocole de reconstitution de GLIC en liposomes présenté dans cette étude, et a réalisé certains des mutants.

Ce travail a abouti à la rédaction d'un article de recherche, soumis pour publication. Les travaux regroupés dans l'article sont présentés dans cette partie ainsi que certains résultats complémentaires non intégrés à la publication.

2.2 Introduction

Au cours des dernières années, la publication de nombreuses structures, obtenues par cristallographie et cryo-microscopie, a permis de générer les premiers modèles, à haute résolution, de transitions allostériques. Ces modèles ont pu être complétés par des études computationnelles ou en solution, notamment par RPE et RMN, apportant une dimension dynamique à la description des transitions allostériques.

Toutefois, comme cela a été décrit dans l'introduction, les méthodes employées à ce jour présentent des limites pour la description des transitions de récepteurs dans leur environnement physiologique. En effet, ces modèles sont, le plus souvent, basés sur des structures « figées » de récepteurs extraits de leur environnement. Il est donc critique de rassembler plus de données expérimentales, obtenues sur des récepteurs libres de leurs mouvements et dans des environnements plus physiologiques, permettant de suivre par des mesures directes, les changements conformationnels associés aux transitions allostériques.

Afin de suivre les réorganisations structurales de GLIC au cours de ces transitions, nous avons appliqué la méthode de quenching induit par les tryptophanes (TrIQ) (Les aspects théoriques de cette technique sont détaillés dans l'introduction partie 8.3). Cette méthode implique la liaison d'un fluorophore, dans notre cas le bimane, au sein d'une région d'intérêt de la protéine, ainsi qu'un tryptophane à proximité de ce bimane. Ces deux fluorophores créent ainsi un couple (ou paire) de quenching. Le quenching du bimane par le tryptophane n'ayant lieu que sur de courtes distances (entre 10 et 15Å), le suivi de la fluorescence permet de dire si les deux senseurs se sont rapprochés (diminution de fluorescence) ou éloignés (augmentation de fluorescence).

Dans cette étude, plus de 20 positions ont été étudiées le long de la structure de GLIC afin de générer une « carte » des réorganisations structurales ayant lieu au cours des transitions allostériques.

Afin de faire le pont entre les données structurales obtenues en détergent et la fonction des récepteurs à la membrane plasmique, les mesures de

fluorescence permettant de caractériser les mouvements de GLIC ont été faites sur les récepteurs purifiés en détergent, et reconstitués en liposomes ; et la fluorescence a été suivie en conditions d'équilibre et en temps réel. Ces expériences nous ont amenés à résoudre une structure d'un mutant de GLIC, portant un bimané lié. Et enfin, pour caractériser fonctionnellement les récepteurs utilisés dans cette étude, un nouveau dérivé du bimané a été synthétisé permettant un marquage efficace de récepteurs à la membrane plasmique de cellules vivantes.

2.3 Développement technique de la méthode TrIQ sur GLIC

2.3.1 Choix du fluorophore et sa caractérisation

Nous avons utilisé un dérivé bromé du bimane, le monobromo Bimane (mBBr), qui peut se lier de façon covalente à une cystéine, permettant de le localiser très précisément au sein des protéines. En solution, le mBBr a un pic d'excitation à 385nm et un pic d'émission à 485nm (Figure 1A).

Ce fluorophore est peu fluorescent dans sa forme non-liée, et montre une très forte augmentation de fluorescence suite à sa réaction avec une cystéine, ce qui permet de limiter le bruit de fond venant de fluorophores n'ayant pas réagi avec la protéine (Figure 1A).

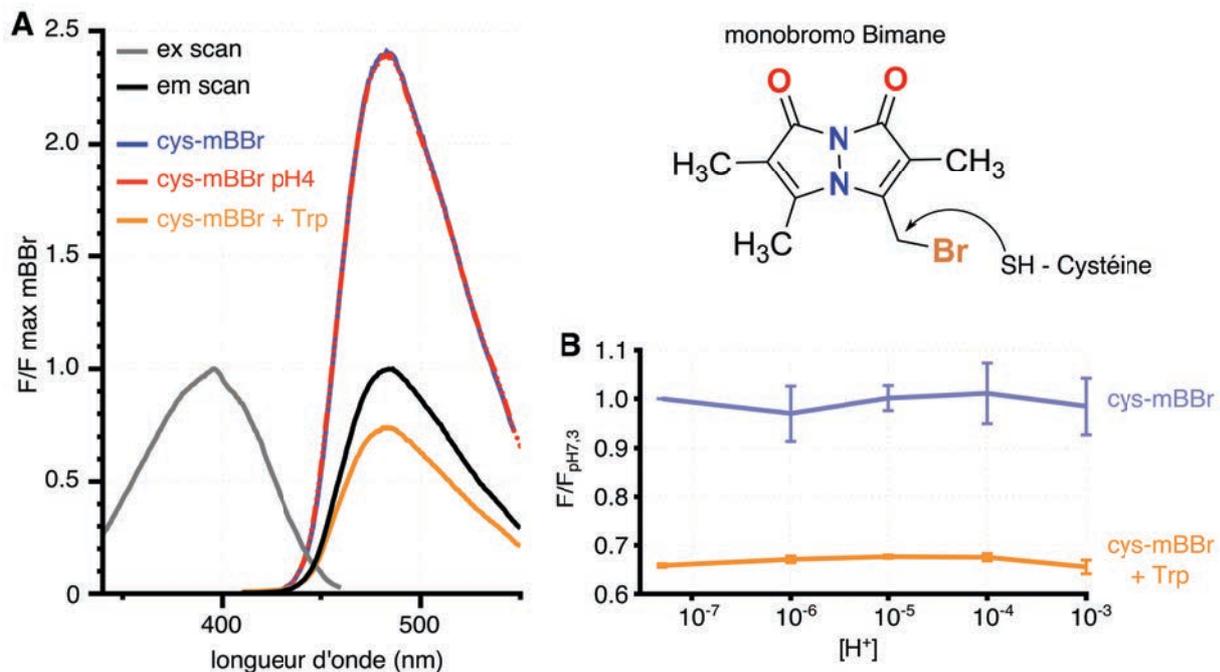


Figure 1 : Caractéristiques spectrales du mBBr. A : Spectres d'émission et d'excitation du mBBr (10 μ M) en solution, après réaction avec des cystéines libres (1mM), acidification du milieu (pH4) ou ajout de tryptophanes libres (25mM). B : Variations de fluorescence du mBBr (10 μ M), lié à des cystéines, à différents pH en absence (trace violette) ou présence (trace orange) de tryptophanes (25mM). Les points présentés ont été mesurés au pic d'émission du mBBr et normalisés par rapport à la fluorescence du cys-mBBr à pH7,3. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (n=3). La structure du mBBr est également représentée, avec une flèche indiquant le site de réaction avec la cystéine, le Br étant le groupe partant.

GLIC étant activé par les protons, j'ai tout d'abord testé l'insensibilité du mBBr à des pH très bas pour m'assurer que les variations de fluorescence que je pourrai enregistrer seraient reportrices d'un mouvement de GLIC et non d'une altération du mBBr par le proton. Ces expériences réalisées à l'équilibre ont confirmé que la fluorescence du mBBr était stable de pH7,3 à pH3 (Figure 1B).

De même, j'ai reproduit les expériences publiées montrant que le bimane est quenché par le tryptophane, en solution dans nos tampons protéiques riches en sels et détergent. J'ai également testé l'insensibilité du quenching du mBBr par les tryptophanes sur une gamme de pHs allant de pH7,3 à pH3 (Figure 1B).

2.3.2 Choix des positions pour suivre les réorganisations structurales de GLIC

Afin de faire réagir le bimane sur le récepteur, j'ai inséré des cystéines en différentes régions de la protéine. Ces insertions ont été faites sur GLIC sans cystéines endogènes (GLIC Cys-less C27S).

Après analyse des structures de GLIC_{pH7} et GLIC_{pH4}, j'ai pu identifier différentes régions à cibler pour suivre les réorganisations structurales de GLIC au cours de l'activation.

J'ai ainsi ciblé 6 régions différentes le long de la protéine pour une insertion de cystéine (Figure 2 et Table 1):

- Le haut de l'ECD avec les positions V135, pointant vers le vestibule, et D136 pointant vers l'interface entre sous-unités.
- Le milieu de l'ECD avec la position R133, pointant vers l'interface entre sous-unités et située au niveau de la poche orthostérique.
- Le bas de l'ECD avec les positions K33 et A34 situées à la pointe de la boucle 2, au dessus des hélices M2 formant le pore.
- L'interface entre le et le TMD avec la position P250 sur la boucle M2-M3 reliant l'hélice M2 au TMD et la position Q193 sur le pré-M1 reliant le au TMD.

- Le haut du pore avec la position E243 située en haut de l'hélice M2 pointant vers l'interface entre sous-unités.
- Le bas du pore avec la position T219 située sur la boucle M1-M2 reliant les deux hélices coté intracellulaire de la protéine.

L'effet de quenchers potentiels, tryptophanes mais aussi tyrosines, sur la fluorescence du bimane à chacune des positions a été caractérisé par des mutations en phénylalanine, cet acide-aminé ne provoquant pas de quenching du mBBr (Jones Brunette and Farrens, 2014; Semenova et al., 2009). En l'absence de quencher endogène, j'ai inséré des tryptophanes à différents endroits autour du site de fixation du mBBr, avec l'aide des structures, afin de générer des paires de quenching et quantifier la direction des mouvements de GLIC (Table 1).

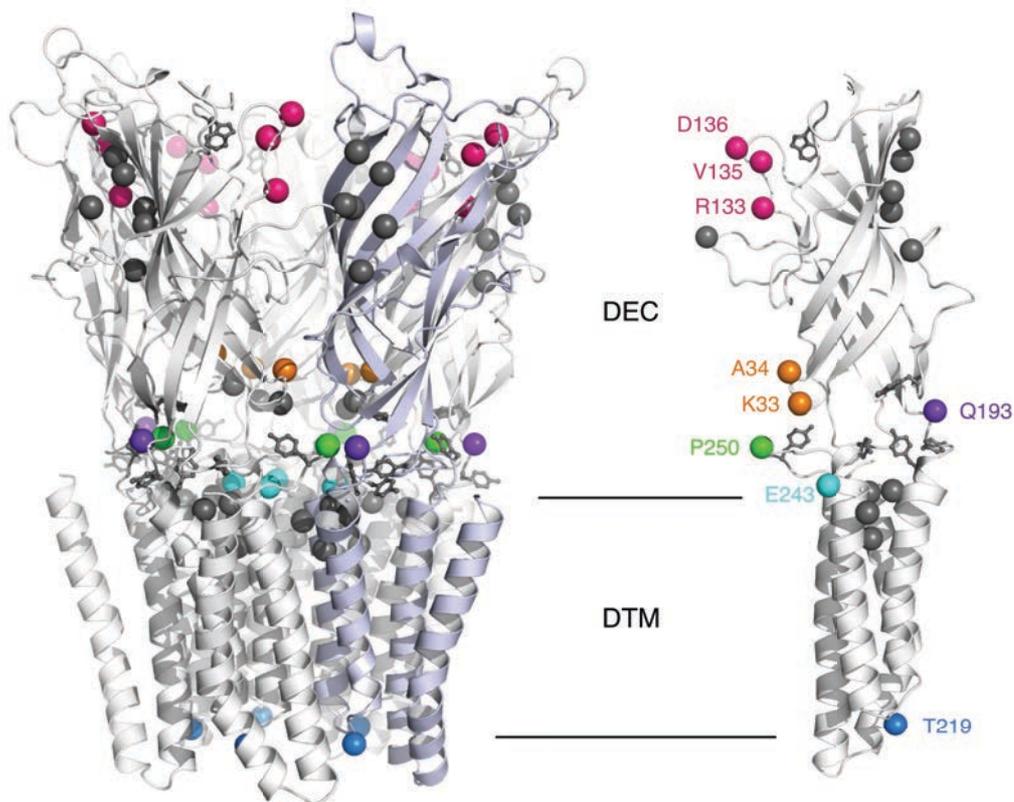


Figure 2 : Positions suivies pour l'étude des transitions allostériques de GLIC. La figure présente la structure de GLIC à pH7 avec toutes les positions mutées en cystéines (colorées) ou en tryptophane/phénylalanine (grises). A gauche est représenté le pentamère entier, avec une seule sous-unité colorée en bleu clair, à droite est représenté un unique monomère vu du pore, le code couleur étant identique sur les deux panneaux. Les tryptophanes et tyrosines endogènes étudiés comme quenchers potentiels sont représentés en mode bâton, et les autres positions mutées en mode sphère.

Région ciblée	Site de liaison du mBBr	Quencher potentiel associé
Haut de l'ECD	V135C	W72
	D136C	S93W Q101W D178W
Milieu de l'ECD	R133C	Y23W S44W Q101W L103W
Bas de l'ECD	K33C	W160
	A34C	W160
Interface ECD/TMD	Q193C	
	P250C	W160 Y119 Y194 Y197 Y251
Haut du pore	E243C	K33W I201W F238W L241W V242W
Bas du pore	T219C	

Table 1 : Couples de quenching. Le tableau présente toutes les mutations réalisées pour une insertion de cystéine, et toutes les positions mutées pour l'insertion de tryptophanes ou l'enlèvement d'un quencher endogène, tryptophanes ou tyrosines.

2.3.3 Estimation du taux de marquage et bruit de fond

Afin de quantifier le rendement de marquage du mBBr sur les récepteurs purifiés, j'ai réalisé des tests d'accessibilité des cystéines en faisant réagir les récepteurs, avant et après marquage par le mBBr, avec le MTS-biotinylé qui peut ensuite être révélé par incubation avec un anticorps fluorescent. Le western blot présenté en figure 3 montre une diminution de marquage au MTS-biotine des récepteurs préalablement marqués au mBBr, montrant une forte réaction du fluorophore sur les mutants cystéine, notamment en position 33 et 136. Toutefois, cette expérience montre également que le marquage n'est pas total et peut varier d'une

position à une autre. GLIC étant un homopentamère, les cystéines de chaque sous-unité sont a priori équivalentes et représentatives des mouvements effectués par le récepteur, ainsi il n'est pas nécessaire d'obtenir un marquage total.

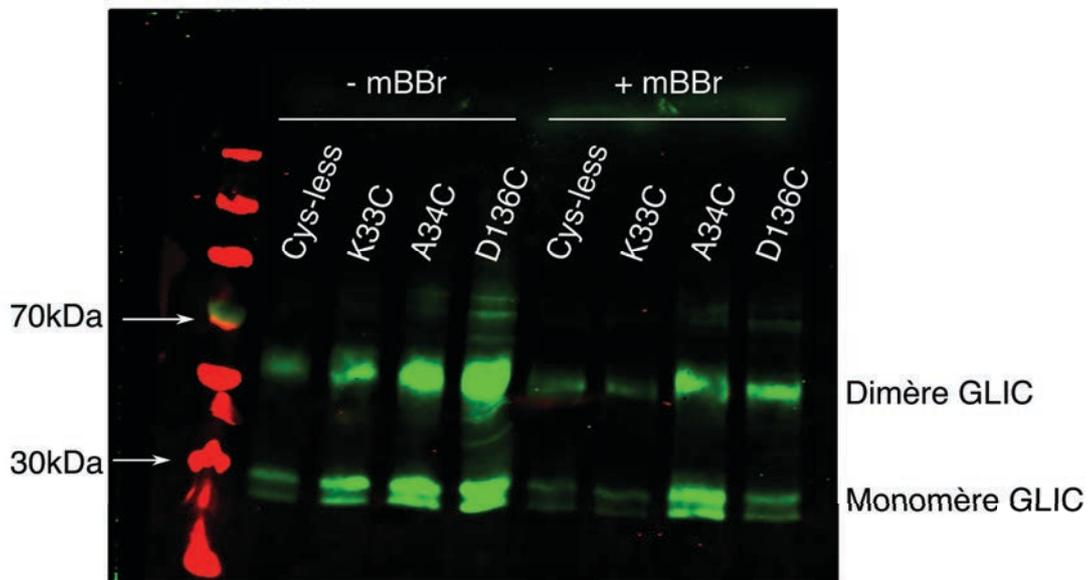


Figure 3: Efficacité du marquage par le mBBr. La figure présente un western blot de différents mutants de GLIC, pré-marqués ou non au mBBr, puis marqués avec un MTS-biotine réagissant avec les cystéines libres. Le western blot a été révélé par un anticorps anti-biotine fluorescent dans l'infrarouge. La détection des échantillons pré-marqués au mBBr étant très faible, une quantité 2 fois supérieure aux échantillons non-marqués au mBBr a été déposée sur le gel.

Le bimaire étant un fluorophore hydrophobe, il est susceptible de partitionner dans les membranes et au sein de la couronne de détergent solubilisant GLIC. Ainsi, j'ai quantifié la fluorescence résiduelle, et donc non-spécifique, du mBBr après marquage des récepteurs et purification. Les enregistrements de la fluorescence du récepteur Cys-less, marqué au mBBr et purifié de façon identique aux récepteurs portant une cystéine, montrent une très faible fluorescence non-spécifique que les récepteurs soient en détergent ou reconstitués en liposomes. Par exemple, pour les récepteurs en détergent, la fluorescence du mutant D136C-mBBr est 10 fois supérieure à celle du Cys-less (Figure 4). Ainsi, pour les enregistrements à l'équilibre il n'est pas nécessaire de soustraire le bruit de fond aux données de fluorescence, cette manipulation des données

pouvant parfois introduire un biais fort, notamment dans le cas de la reconstitution en liposomes qui peut s'avérer variable d'un mutant à l'autre.

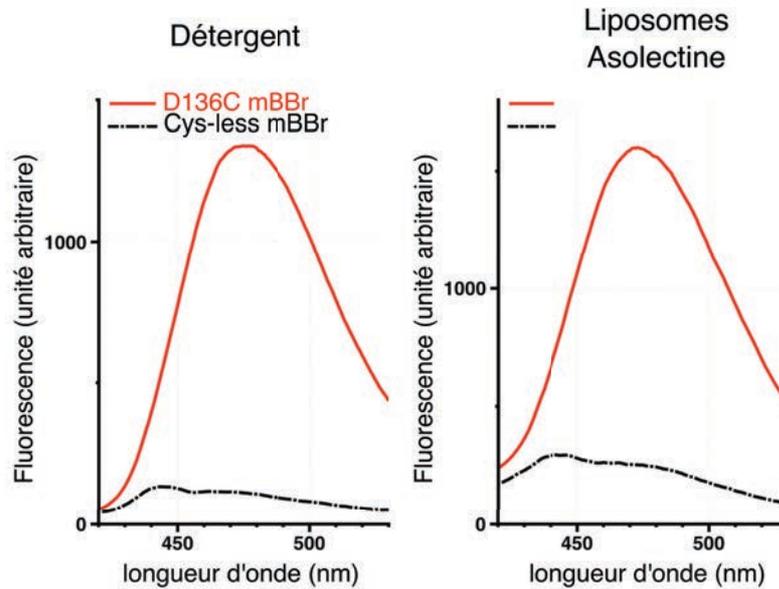


Figure 4: Evaluation du bruit de fond en fluorescence. Les deux panels présentent des spectres d'émission de D136C-mBBr et du Cys-less-mBBr après marquage au bime et purification par filtration sur gel. La quantité de chaque mutant enregistré est similaire au sein d'un graphique. Les traces de gauche ont été enregistrées sur des récepteurs en détergent, et les traces de droite sur des récepteurs reconstitués en liposomes.

2.4 Analyse des paires de quenching en détergent

La première série d'expériences a été réalisée sur le récepteur GLIC solubilisé en détergent (dodécylmaltoside). Afin de caractériser l'impact de l'environnement protéique sur le mBBr au sein de récepteurs à l'état de repos, les valeurs de fluorescence enregistrées à différents pHs ont été systématiquement normalisées par la fluorescence des récepteurs en conditions dénaturantes (1%SDS).

2.4.1 Variations de fluorescence en haut et au milieu du domaine extracellulaire

L'intensité de fluorescence du mBBr lié à la position D136C (noté mBBr136) à pH7,3 est similaire à celle en conditions dénaturantes indiquant un faible impact de l'environnement protéique sur le mBBr à cette région. A l'inverse, la même comparaison effectuée pour le mBBr133 montre une fluorescence deux fois plus élevée à pH7,3 qu'en SDS, avec un déplacement du pic d'émission de 15nm vers les basses longueurs d'ondes (Figure 5 et 6). Cette observation indique que la position 133 se trouve au sein d'un environnement hydrophobe et/ou contraint. Aux deux positions mBBr136 et mBBr133, la fluorescence montre peu de variations à tous les pHs testés, de pH7,3 à pH3, indiquant une absence, ou un faible effet, de possibles quenchers endogènes dans la proximité du mBBr (Figure 6B,C).

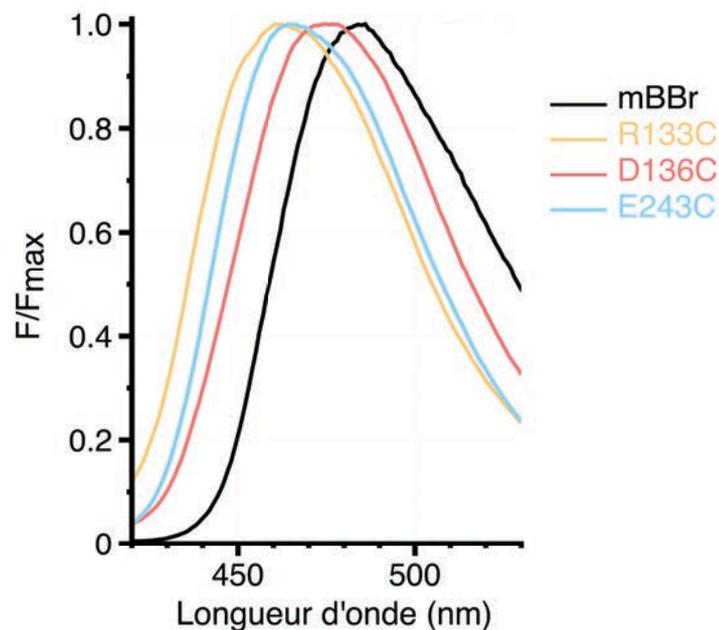


Figure 5 : Déplacements du pic d'émission de mutants mBBr-GLIC. La figure présente les spectres d'émission des mutants mBBr133, mBBr136 et mBBr243 ainsi que le spectre du mBBr seul en solution. Chaque spectre est normalisé par rapport à son intensité maximale.

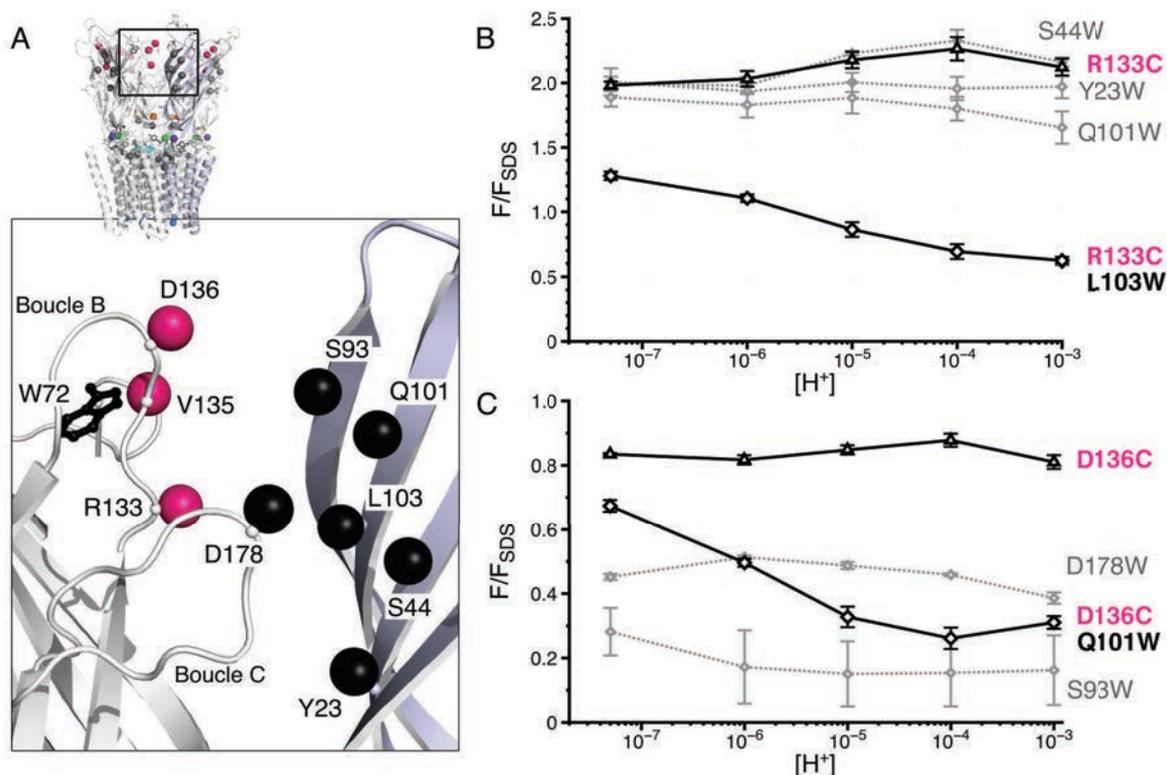


Figure 6 : Variations de fluorescence du haut de l'ECD. A : Zoom sur l'interface entre deux sous-unités de la moitié haute de l'ECD. Les positions mutées en cystéines pour la liaison du mBBr sont représentées par des sphères roses, les positions d'insertions de tryptophanes par des sphères noires. Le tryptophane endogène W72 est représenté par des bâtons. B et C : Variations de fluorescence des simples et doubles mutants mBBR133 et mBBR136. Les valeurs présentées sont normalisées par rapport à la fluorescence de chaque mutant dénaturé (1%SDS). Les couples de quenching principaux sont indiqués en gras et couleurs, et les couples secondaires en gris. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Afin de caractériser les réorganisations au sein de ces régions, j'ai introduit plusieurs tryptophanes, un à un, sur le feuillet β situé de l'autre côté de l'interface entre sous-unités (Figure 6A). A la position mBBR136, l'insertion d'un tryptophane à la position S93 entraîne une forte diminution de la fluorescence, observée à tous les pHs testés, de 0,3 à pH7,3 à 0,2 à pH3. Cette observation indique que le W93 se situe toujours dans la sphère de quenching du bime, et donc que les deux positions sont séparées par des distances très courtes. A l'inverse, les positions W44, W23 et W101 impactent faiblement la fluorescence du mBBR133, suggérant dans ces cas que tous les tryptophanes insérés se situent à

des distances trop importantes de la position mBBR133 pour induire un quenching (Figure 6B).

Notons le cas particulier de la paire de quenching mBBR136-W178 ; dans ce cas le tryptophane n'a pas été inséré sur le feuillet opposé mais au sein de la même sous-unité que le mBBR, sur la boucle C. Les enregistrements réalisés montrent une diminution de la fluorescence du mBBR de 50% indiquant que les deux positions sont proches, cependant l'invariabilité de la fluorescence à toutes les concentrations de protons testées indique que la position relative du mBBR et du W178 est constante (Figure 6C).

Toutefois, la position W101 pour le mBBR136 et la position W103 pour le mBBR133, entraînent une baisse de fluorescence dépendante du pH, passant de 0,7 à pH7,3 à 0,3 à pH4, et de 1,3 à pH7,3 à 0,7 à pH4 respectivement. Cette observation indique que ces deux paires de quenching se rapprochent lors de la transition du récepteur (Figure 6B,C).

A la position mBBR135, l'évolution de la fluorescence en fonction du pH montre une forme en U, allant de 0,7 (pH7,3) à 0,4 (pH5) puis à 0,6 (pH3) (Figure 7C). Cette observation suggère l'effet d'un, ou plusieurs, quencher endogènes sur la fluorescence à cette position. L'examen de la structure de GLIC révèle la présence d'un tryptophane (W72) à proximité de la position 135 (Figure 6A et 7A,B). Ce tryptophane est engagé dans un motif structural ultra conservé chez les RCPs, la boîte WPW, et il est hautement probable que sa mutation en phénylalanine empêcherait le repliement correct du récepteur. Afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire en jeu à cette position, nous avons donc résolu la structure du mutant de GLIC mBBR135 (Figure 7A,B).

Cette structure obtenue à pH4 avec une résolution de 2,6 Å est quasi-identique à la structure GLIC_{pH4} sauvage (RMSD=0,26Å) et montre des densités électroniques additionnelles sur deux sous-unités au niveau de la cystéine 135. Ces densités ont permis la construction non-équivoque d'un bimane à ces positions ainsi situé à 3,2Å du W72 de la même sous-unité (Figure 7A,B). Ainsi, le W72 est très probablement responsable du phénotype de fluorescence observée avec le mBBR135 bien que

l'impossibilité de le muter ne permette pas une interprétation structurale définitive des données de fluorescence.

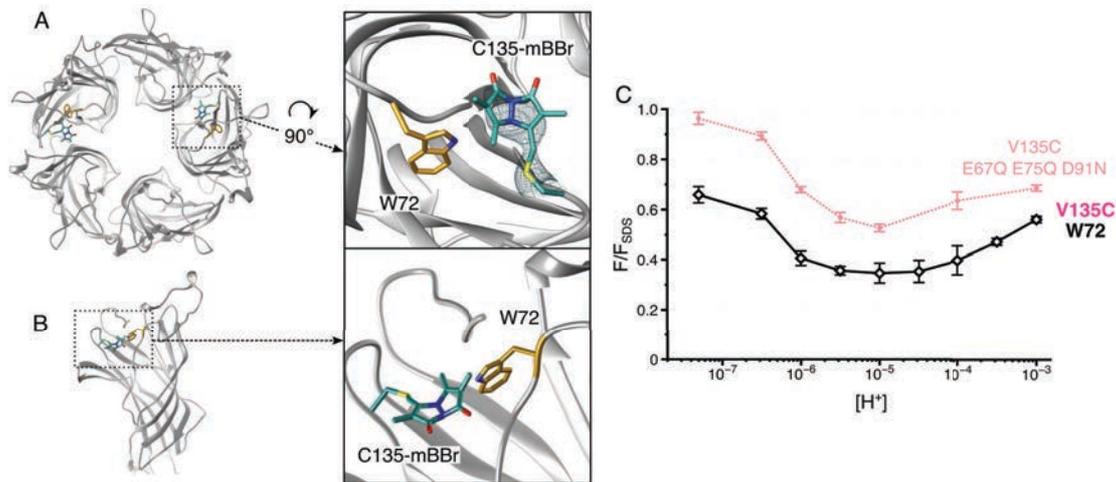


Figure 7 : Structure et variations de fluorescence du mBBR135. A,B : Le résidu C135-mBBR est représenté en vert, et le résidu W72 en or. A: Vue de dessus et zoom du pentamère de GLIC à pH4 portant la mutation V135C et ayant réagi avec le mBBR. Sur le zoom, la densité électronique du mBBR est représentée. B : Vue de côté et zoom de l'ECD d'une sous-unité montrant que le C135-mBBR et le W72 sont à la même hauteur. C : Variations de fluorescence du mBBR135 seul et du mBBR135 où les résidus titrables voisins ont été mutés (E67Q E75Q D91N). Les valeurs présentées sont normalisées par rapport à la fluorescence du mutant dénaturé (1%SDS). Toutes les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

De plus, et comme détaillé dans la partie 1.3, les mesures en solution montrent que le bime est insensible aux variations de pH, mais il est possible que la protonation de résidus aux alentours du mBBR affecte sa fluorescence sans implication de mouvements allostériques. Il y a trois résidus protonables dans la région du mBBR135, je les ai donc mutés en leur version protonée (E67Q, E75Q, D91N). Ce quadruple mutant montre un profil général de fluorescence identique au mBBR135 « sauvage », même si l'on observe une intensité générale plus élevée à tous les pHs, indiquant que les variations de fluorescence à cette position sont bien dues aux mouvements allostériques, notamment au rapprochement du tryptophane 72 (Figure 7C).

2.4.2 Variations de fluorescence en bas du domaine extracellulaire

Au sein de la boucle 2, la position mBBr33 montre une décroissance de fluorescence dépendante de la concentration en agoniste, d'une intensité allant de 0,8 à 0,4, de pH7,3 à pH4 (Figure 8). A proximité de cette position se trouve un tryptophane endogène (W160) qui peut être muté en phénylalanine. La substitution W160F abolit la majorité des variations de fluorescence du mBBr33, avec une diminution de fluorescence de 20% à pH6 suivie d'un retour à des intensités identiques à pH7,3 pour le reste des concentrations testées (Figure 8). Ainsi ces données indiquent que la diminution de fluorescence mesurée à la position mBBr33 est due principalement à un rapprochement avec la position W160.

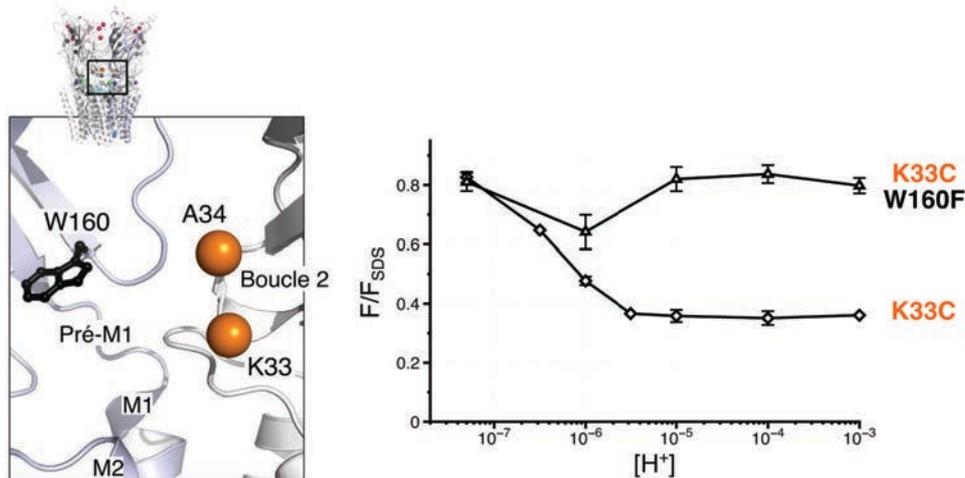


Figure 8 : Variations de fluorescence au sein de la boucle 2. Gauche: zoom sur la région de la boucle 2, vue depuis l'intérieur du pentamère. Le tryptophane endogène W160 est représenté par des bâtons en noir, et les deux sites d'insertion de cystéine et marquage au mBBr sont représentés par des sphères et colorés en orange. Droite : Variation de fluorescence du mutant mBBr33, les valeurs présentées sont normalisées sur la fluorescence des récepteurs dénaturés (1%SDS). Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

J'ai également testé la position mBBr34 au sein de la boucle 2 et les enregistrements à l'équilibre montrent que la fluorescence à cette position est très faible et difficilement détectable. De plus, la fluorescence de la protéine dénaturée est plus de deux fois supérieure à celle de la protéine native, indiquant la présence d'un quencher à proximité du mBBr. La

mutation W160F couplée à mBBR34 permet d'augmenter le signal de fluorescence indiquant que les deux positions sont proches, même en absence d'agoniste. Toutefois, les mesures à pH4 montrent une faible variation de la fluorescence, avec seulement 10% de diminution. L'impact du tryptophane endogène W160 étant très important et les variations de fluorescence relativement faibles, cette position n'est pas idéale pour le suivi des réorganisations de GLIC et n'a donc pas été caractérisée en détail.

2.4.3 Variations de fluorescence à l'interface entre domaines extracellulaire et transmembranaire

La fluorescence observée à la position mBBR250 montre, à l'inverse des positions précédemment discutées, une augmentation de fluorescence avec l'augmentation de la concentration d'agoniste. La fluorescence normalisée, à pH7,3, est de 0,6 puis augmente jusqu'à 0,8 à pH3 indiquant la présence d'un quencher à proximité de mBBR250 lorsque le récepteur est au repos (Figure 9B). L'étude des structures de GLIC révèle la présence de cinq quenchers potentiels, un tryptophane (W160) et quatre tyrosines (Y119, Y194, Y197 et Y251), qui ont tous été mutés individuellement en phénylalanine afin d'estimer leur participation dans les variations de fluorescence mesurées (Figure 9A). Les mutants mBBR160-W160F et mBBR250-Y194F montrent des variations de fluorescence similaires à celles du simple mutant, avec toutefois une intensité globale plus élevée, indiquant un quenching identique par W160 et Y194 dans toutes les conformations visitées par le senseur mBBR250. Notons cependant que le mutant mBBR250-W160F est non fonctionnel en électrophysiologie, les réorganisations à cette région pouvant donc être perturbées (Table 3). La mutation Y119F entraîne quant à elle une augmentation de la fluorescence de 20% à pH7, contre une diminution de 20% à pH3, par rapport au simple mutant, indiquant une participation complexe de cette position au phénotype général. Enfin, les deux mutations Y251F et Y197F abolissent les variations de fluorescence mesurées à tous les pHs (Figure 9B). Cependant, le double mutant

mBBR250-Y251F n'est pas fonctionnel, ainsi, s'il est clair que Y251 a un impact sur la fluorescence du bimane, ce mutant ne peut pas être utilisé pour étudier une transition dans cette région (Table 3). A l'inverse, le mutant mBBR250-Y197F étant fonctionnel, les données de fluorescence indiquent qu'à pH7,3 les deux positions sont proches et qu'elles s'éloignent lorsque le récepteur est en présence d'agoniste (Figure 8B).

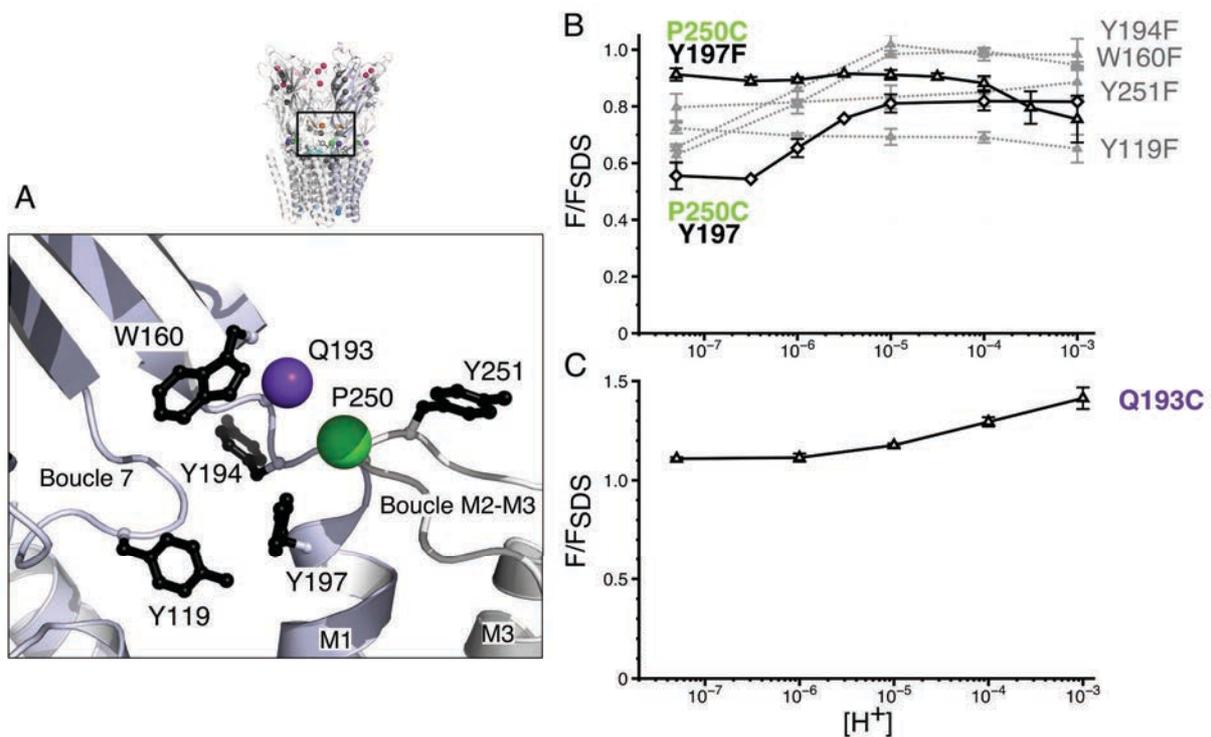


Figure 9 : Variations de fluorescence à l'interface entre l'ECD et le TMD. A : Zoom sur l'interface entre l'ECD et le TMD, vue depuis le pore du récepteur. Les positions mutées pour l'insertion d'une cystéine et réaction avec le mBBR sont représentées par des sphères colorées, les quencher potentiels endogènes sont représentés par des bâtons colorés en noir. B,C : Variations de fluorescence pour les simples et doubles mutants des positions mBBR250 ou mBBR193. Toutes les valeurs sont normalisées sur la fluorescence de chaque mutant dénaturé, et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La deuxième position étudiée, mBBR193, située à l'interface entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire, sur le segment pré-M1, montre une fluorescence de 1,1 à pH7, c'est à dire similaire à la fluorescence en conditions dénaturantes, indiquant ainsi peu d'effet de l'environnement sur la sonde à l'état de repos du récepteur. Suite à des applications croissantes de proton, on peut observer une augmentation de

la fluorescence à partir de pH4 jusqu'à 1,4 à pH3 (Figure 9C). Cette augmentation de fluorescence n'étant pas accompagnée d'un déplacement du pic d'émission, elle suggère que la sonde s'éloigne d'un quencher potentiel et non un mouvement vers un environnement plus hydrophobe. L'étude de la structure de GLIC à cette position indique la présence de multiples quenchers potentiels, tyrosines et tryptophane, à proximité de mBBR193 (Figure 9A). Toutefois, le mutant mBBR193 n'étant pas fonctionnel, il nous a semblé peu opportun d'augmenter le nombre de mutations au sein de cette région, ce qui pourrait augmenter les perturbations fonctionnelles du récepteur et rendrait toute interprétation structurale incertaine. De plus, ces variations de fluorescence ne sont visibles qu'à de hautes concentrations en agoniste. Cependant, cette position étant utilisée sur le récepteur glycine comme reportrice de mouvements effectués au cours de la désensibilisation (Wang and Lynch, 2011b), il peut être envisagé que ce soit également le cas pour GLIC. Cette hypothèse sera abordée dans la partie suivante sur la caractérisation de la désensibilisation de GLIC.

2.4.4 Variations de fluorescence dans le domaine transmembranaire

Au niveau du domaine transmembranaire de GLIC, j'ai également suivi les variations de fluorescence à la position mBBR243, située en haut de l'hélice M2 (position 19') (Figure 10). A pH7,3, l'intensité de fluorescence est 1,6 fois plus élevée qu'en conditions dénaturantes et est observée à des longueurs d'onde déplacées vers la gauche de 10nm, indiquant un environnement hydrophobe et/ou confiné à cette position (Figure 6). En présence d'agoniste, la fluorescence diminue jusqu'à 1,1 à pH4 suivie par une augmentation à 1,4 à pH3, laissant supposer des réorganisations complexes à cette région. Ainsi, pour caractériser ces mouvements, j'ai inséré des tryptophanes à diverses positions autour de la sonde (Figure 10). Cependant, la plupart de ces mutations se sont avérées non fonctionnelles et n'impliquent dans aucun cas des variations de fluorescence en présence de proton (Figure 10 et Table 3). Néanmoins, l'impact de chacun de ces tryptophanes sur la fluorescence de mBBR243 à

pH7,3 permet de localiser approximativement la sonde fluorescente. En effet, les positions W201 sur l'hélice M1, W241, W242 et W238 sur l'hélice M2, ainsi que la position W33 sur la boucle 2 impliquent toutes un quenching du mBBR243 suggérant que le fluorophore pointe vers les hélices transmembranaires de la sous-unité adjacente et que les variations de fluorescence du simple mutant rendent compte des réorganisations dans cette région.

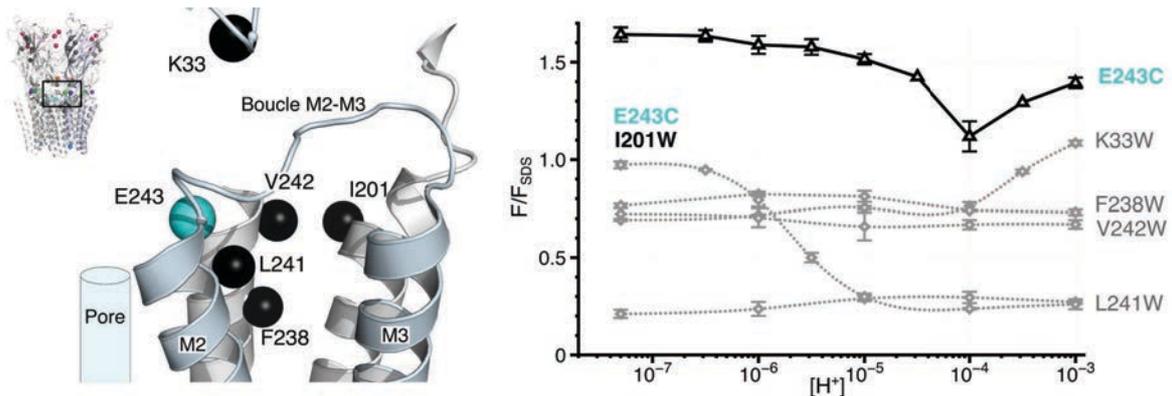


Figure 10 : Variations de fluorescence au sein du TMD. Gauche : zoom sur le haut du TMD de deux sous-unités. Les positions mutées pour l'insertion d'une cystéine (bleu) et d'un tryptophane (noir) sont représentées par des sphères. Droite: Variations de fluorescence des simple et doubles-mutants mBBR243. Toutes les valeurs de fluorescence sont normalisées par rapport à la fluorescence de chaque mutant dénaturé (1%SDS) et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Une position fait cependant exception, en effet, le mutant mBBR243-W201 (non-fonctionnel) montre une forte diminution de la fluorescence dépendante de la concentration en proton. A pH7,3 la fluorescence normalisée du double mutant est 40% plus faible que le simple mutant, cette diminution allant jusqu'à 85% à pH4 (Figure 10). Ces mesures montrent que les deux positions, l'une sur l'hélice M2, l'autre sur l'hélice M1, se rapprochent en présence d'agoniste.

2.4.5 Variations de fluorescence dans la région intracellulaire

Afin de caractériser les réorganisations structurales de GLIC dans son ensemble, j'ai également ciblé la partie intracellulaire du récepteur, à la position T219C, sur la boucle M1-M2.

La fluorescence normalisée de mBBR219 indique qu'il n'y a aucun impact de l'environnement protéique sur la sonde à cette position. De même, aucune variation de fluorescence n'est enregistrée suite à des applications de protons en concentrations croissantes indiquant que le récepteur n'effectue pas de mouvement dans cette région (Figure 11). La mutation se situant dans la partie intracellulaire de la protéine, la fonction du récepteur marqué n'a pas pu être vérifiée et il est donc envisageable que la liaison du mBBR entraîne une perte de fonction résultant en une absence de mouvement. Toutefois cela semble peu probable étant donné la localisation de T219C, dans un environnement peu contraint et n'effectuant pas de contact avec les résidus alentours.

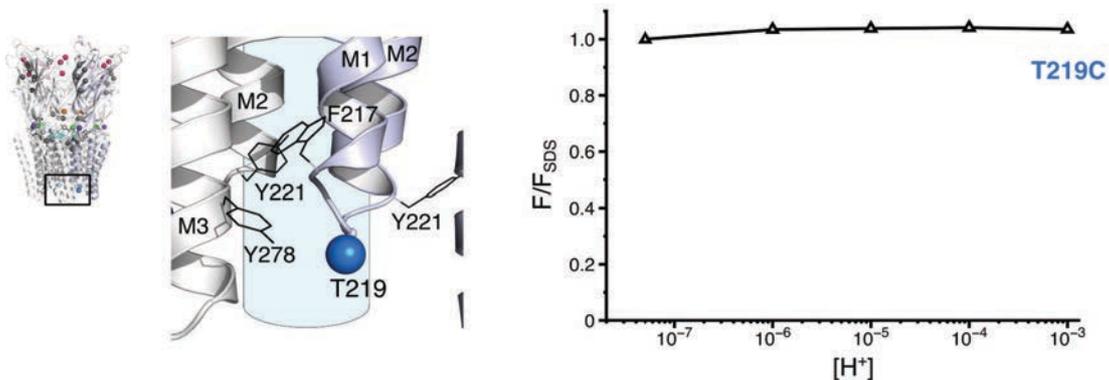


Figure 11 : Variations de fluorescence au niveau de la boucle M1-M2. Gauche : Zoom sur le bas du TMD, à l'interface entre deux sous-unités. Le site d'insertion de la cysteine et de réaction du mBBR est représenté par une sphère bleue. Les résidus endogènes pouvant agir comme quencher sont représentés par des lignes noires. Droite : Valeurs de fluorescence du mutant mBBR219 normalisées par rapport à la fluorescence du récepteur dénaturé (1%SDS).

2.5 Comparaison des réorganisations observées en détergent et en liposomes

Afin d'étudier l'impact de l'environnement membranaire sur les réorganisations précédemment décrites, les principaux couples de quenching de GLIC marqués au mBBr ont été reconstitués en liposomes d'asolectine, un mélange de lipides eucaryotes précédemment utilisé pour des reconstitutions fonctionnelles de GLIC (Labriola et al., 2013; Velisetty and Chakrapani, 2012c).

Dans le but de comparer les variations de fluorescence entre les deux environnements, les données présentées dans cette partie sont normalisées sur la fluorescence de chaque mutant en l'absence d'agoniste (pH7,3). Toutefois, l'impact de la reconstitution en liposomes sur la fluorescence de chaque position à pH7,3, c'est à dire à l'état de repos, est résumée dans la table 2.

Mutant	F/F_{SDS} en détergent	F/F_{SDS} en liposomes
R133C	1,98 ± 0,03	1,91 ± 0,02
R133C L103W	1,28 ± 0,03	1,182 ± 0,003
V135C W72	0,66 ± 0,03	0,76 ± 0,03
D136C	0,835 ± 0,003	0,87 ± 0,03
D136C Q101W	0,67 ± 0,02	0,69 ± 0,02
K33C W160	0,83 ± 0,02	1,09 ± 0,03
K33C W160F	0,81 ± 0,08	0,87 ± 0,02
E243C	1,68 ± 0,02	1,60 ± 0,01
E243C I201W	0,97 ± 0,02	0,94
P250C Y197	0,55 ± 0,05	0,60 ± 0,01
P250C Y197F	0,93 ± 0,01	1,42 ± 0,08

Table 2 : Comparaison de la fluorescence à pH7,3/8 en détergent et en liposomes. Le tableau présente les valeurs de fluorescence à la plus basse concentration d'agoniste testée, normalisées sur la fluorescence en conditions dénaturantes (1%SDS). Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Les positions situées en haut (mBBr135 et mBBr136 +/- W101) et au milieu de l'ECD (mBBr133 +/- W103) montrent une fluorescence quasiment identique en détergent ou en liposomes, tant pour l'intensité globale que pour les variations enregistrées (Figure 12A,B,C et Table 2).

Ces données indiquent que les réorganisations au sein de ces régions sont indépendantes de l'environnement membranaire des récepteurs.

Au niveau de l'interface, la reconstitution en liposomes des mutants mBBR33 et mBBR250-Y197F entraîne une augmentation de la fluorescence à pH8 (par rapport à pH7,3 en détergent) de 30% et 50% respectivement (Table 2). Cependant, les variations de fluorescence en fonction du pH sont quant à elles conservées dans les deux environnements, à l'exception de mBBR33-W160F qui montre une fluorescence plus importante à tous les pHs (Figure 12D,F). De même, à la position mBBR243, la fluorescence est plus élevée à pH4 en liposomes qu'en détergent. Notons d'ailleurs que les variations de fluorescence du double mutant non fonctionnel mBBR243-I201W sont parfaitement superposables que le récepteur soit en détergent ou en liposomes, montrant une insensibilité de ce mouvement particulier à l'environnement membranaire (Figure 12E).

Les deux positions mBBR33 et mBBR243 se situent à proximité du pore de GLIC, pore dans lequel ont été observées six molécules de détergent dont cinq sont orientées avec leur groupement maltoside vers le haut du pore, à proximité de la position 243 mais surtout de 33 (Bocquet et al., 2009). La position mBBR250 est quant à elle à proximité de la couronne extérieure de détergent. La reconstitution de GLIC en liposomes incluant le retrait de toutes les molécules de détergent, il est envisageable que l'absence de détergent à ces positions, ou leur remplacement par des lipides, puisse avoir un impact sur la fluorescence du mBBR, indépendamment des réorganisations effectuées à ces positions. Toutefois, ces différences sont mineures ($\Delta F_{\max}=0,2$ pour mBBR243 et 0,3 pour mBBR33-W160F) et suggèrent que l'ensemble des mouvements observés sont conservés dans les deux environnements membranaires (Figure 12).

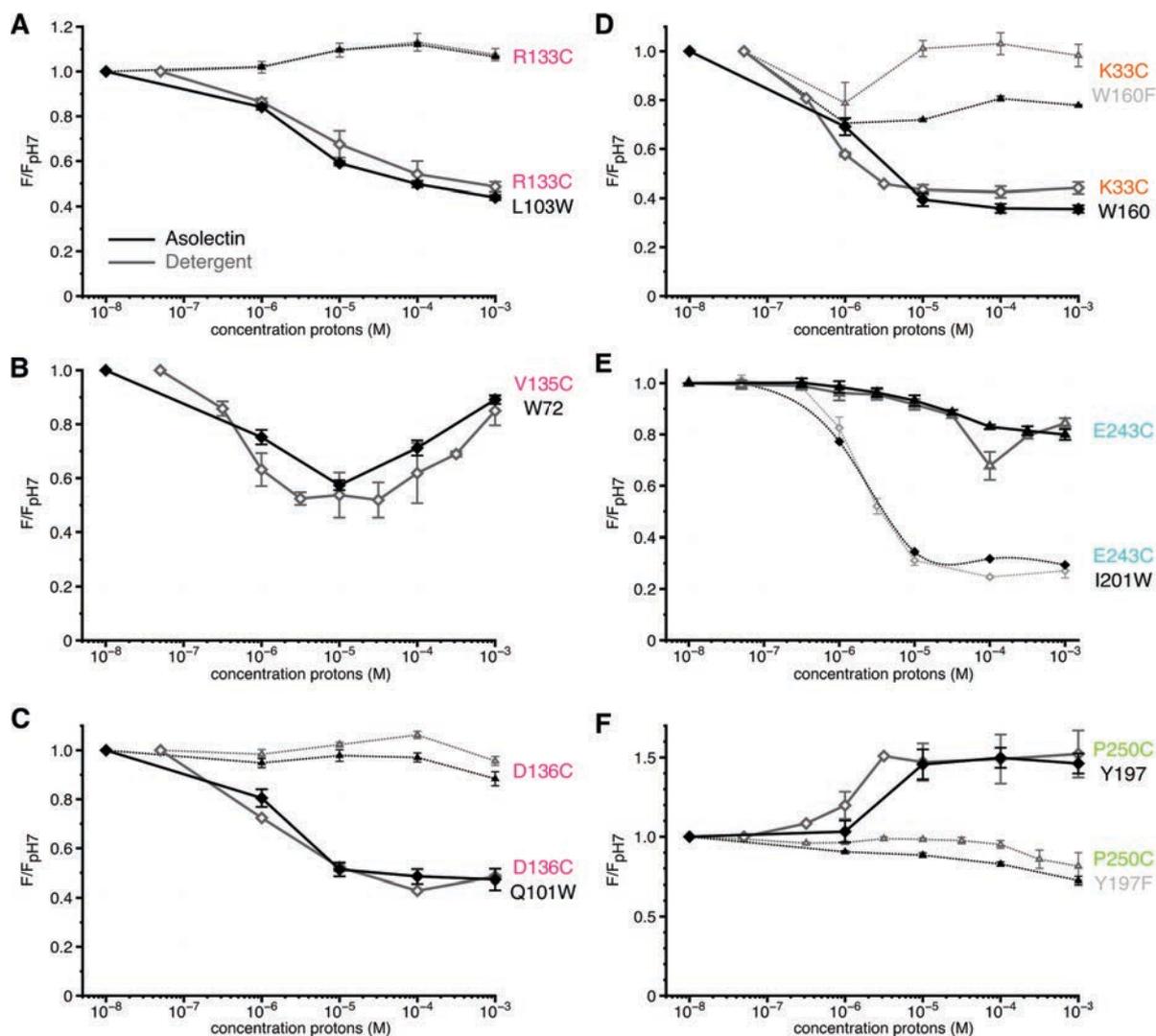


Figure 12 : Variations de fluorescence de GLIC en liposomes. A, B, C, D, E, F : Valeurs de fluorescence à chaque pH, normalisées par rapport à la fluorescence de chaque mutant à pH7. Les lignes noires représentent les valeurs obtenues en liposomes, et en gris les valeurs en détergent, pour comparaison. Les lignes pleines représentent les couples de quenching principaux et les lignes en pointillés les mêmes mutants sans quenchers, ou d'un couple de quenching secondaire dans le cas de mBBR243. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

2.6 Caractérisation fonctionnelle des mutants de GLIC marqués au bimane

Afin d'estimer le marquage par le bimane de récepteurs exprimés à la membrane d'ovocytes, j'ai utilisé un mutant « rapporteur », GLIC Q193C. En effet, la liaison d'un composé à cette position, aussi petit qu'un méthyl-methanethiosulfonate (MMTS), entraîne une perte de fonction quasiment totale des récepteurs, permettant ainsi d'estimer qualitativement la réussite du marquage des cystéines libres (Voir méthodes).

Les ovocytes exprimant le mutant Q193C mis en présence de mBBr ne montrent pas de perte de fonction, et ne sont pas protégés du marquage au MMTS indiquant que le fluorophore n'a pas ou peu réagit à cette position. En effet, l'observation par microscopie confocale de cellules mammifères CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant des mutants cystéine de GLIC et marquées au mBBr, montre une entrée massive du fluorophore dans le cytoplasme et ne permet pas l'observation d'un marquage à la membrane. De façon étonnante, le marquage des mêmes cellules par un dérivé du bimane, le qBBr, chargé positivement et commercialisé en tant que fluorophore non perméant à la membrane, montre un résultat identique avec une forte entrée du fluorophore dans le cytoplasme (Figure 13A). Cette observation est particulièrement surprenante car différentes études ont rapporté utiliser le qBBr pour marquer spécifiquement les cystéines libres à la membrane de cellules (Huang et al., 1984; Kosower et al., 1979; Semenova et al., 2009). Toutefois, cette imperméabilité au qBBr semble dépendre du type de cellules utilisées (communication personnelle de B.S. Rothberg).

Afin de diminuer l'hydrophobicité du bimane et empêcher son passage à travers la membrane plasmique, nos collaboratrices D. Joseph et E. Drège ont proposé et synthétisé un nouveau dérivé du fluorophore, le Bimane sel de Bunte (BBs), portant un groupe partant chargé négativement SO_3^- (Figure 14A). Le BBs réagit avec les cystéines par formation d'un pont

disulfure, et les produits de réaction du mBBr et du BBs sont quasiment identiques en volume, mais également en fluorescence (Figure 14B).

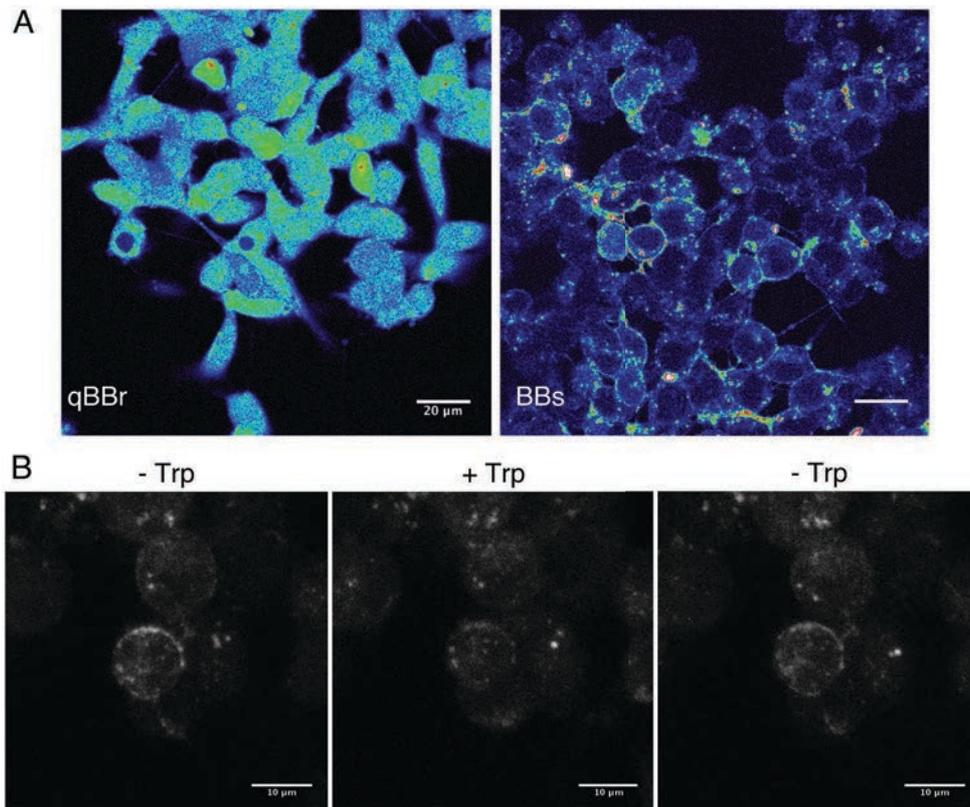


Figure 13: Marquage au bimaire de cellules CHO. A,B : Les images sont celles de cellules positives pour le marqueur de transfection (mCherry) et excitées par laser à 405nm. A : Comparaison entre le marquage de CHO exprimant un mutant cystéine de GLIC marquées par du qBBr (gauche) ou du BBs (droite). B : Projection sur l'axe Z de 12 sections (100nm) prises sur la même cellule marquée au BBs, avant, pendant et après perfusion par une solution de 50mM Trp.

Après marquage par le BBs, les cellules CHO, transfectées avec des mutants cystéine de GLIC, montrent une faible entrée du fluorophore dans le cytoplasme et un marquage robuste à la membrane plasmique (Figure 13A). De plus, la perfusion d'une solution de tryptophane sur ces cellules montre un quenching effectif de la fluorescence à la membrane, indiquant qu'il s'agit bien d'un marquage sur la partie extracellulaire des récepteurs, et non un partitionnement du fluorophore au sein de la membrane (Figure 13B).

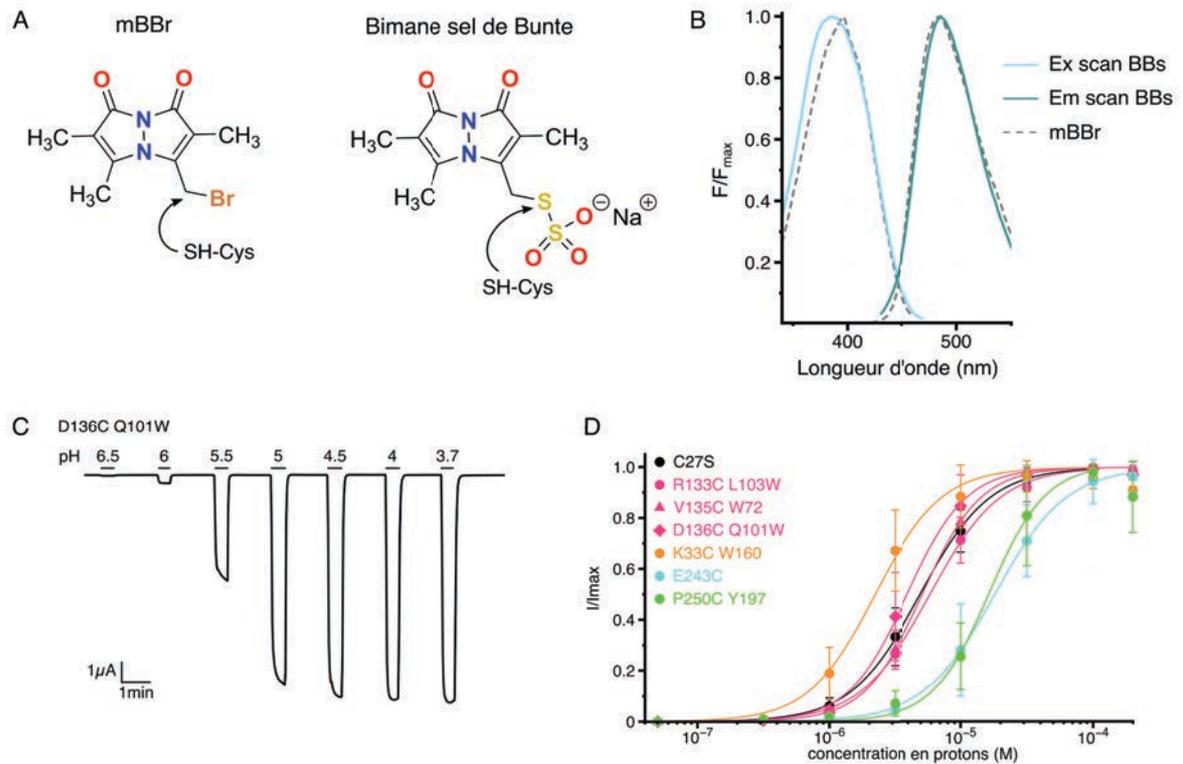


Figure 14 : Caractéristiques du BBs et fonction des récepteurs marqués. A : Structures du mBBr et BBs (Bimane sel de Bunte). Les flèches indiquent le site de réaction de la cystéine. B : Spectres d'excitation (bleu) et d'émission du BBs (vert). Les spectres du mBBr sont indiqués pour comparaison (gris). Tous les spectres ont été normalisés sur leur intensité maximale. C : Trace électrophysiologique typique pour une courbe dose-réponse après marquage au BBs. D : Courbes dose-réponse des principaux mutants après marquage au BBs, ajustées à l'équation de Hill. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Tous les mutants présentés dans cette étude sont fonctionnels, générant des courants robustes à la membrane plasmique, à l'exception de Q193C, P250C-W160F, E243C-K33W -I201W -V242W, mentionnés précédemment (Table 3).

Chaque mutation a été caractérisée par la réalisation d'une courbe dose-réponse avant et après marquage au BBs, et la plupart des mutants montrent des temps d'activation lents, avec un plateau atteint en 30s, typiques de la fonction de GLIC (Figure 14C).

Pour toutes les positions principales, l'insertion de mutations n'a pas d'impact fonctionnel avant marquage au BBs, à l'exception du mutant K33C-W160F qui présente une courbe dose-réponse déplacée vers les

bas pH avec un ΔpH_{50} de 0,76. Après marquage au BBs, la plupart des positions montrent un léger déplacement de la courbe dose-réponse vers les bas pHs, avec un ΔpH_{50} maximum de 0,5, à l'exception des deux doubles-mutants E243C-F238W et E243C-L242W qui montrent un ΔpH_{50} de 0,9 (Figure 14D et Table 3).

Ces données montrent que le marquage par le petit fluorophore BBs affecte peu la fonction des récepteurs pour la majorité des positions testées.

De façon intéressante, la comparaison des courbes doses-réponses obtenues par mesures électrophysiologiques (ΔI) et par mesures de fluorescence (ΔF), révèle des différences dans la quantité d'agoniste nécessaire pour effectuer un mouvement ou ouvrir le canal et donc stabiliser la conformation active du récepteur (Figure 15). En effet, pour les positions mBBr135 et mBBr250 cette différence s'élève à $\Delta\text{pH}=0,8$ et $0,7$ respectivement, ainsi que, dans une moindre mesure, $\Delta\text{pH}=0,4$ pour la position mBBr136-W101 (Figure 15 et Table 3).

Les liposomes et la membrane plasmique des ovocytes étant deux environnements membranaires distincts, il est difficile de comparer les données de fluorescence obtenue dans l'un avec les données fonctionnelles obtenues dans l'autre. Cependant, les enregistrements électrophysiologiques de GLIC reconstitué en liposomes indiquent que les récepteurs sont activés à une concentration en proton supérieure de plus de deux ordres de grandeur à celle utilisée en cellule (Velisetty and Chakrapani, 2012c). L'ensemble des données suggère ainsi que les mouvements effectués en liposomes décrits par les variations de fluorescence nécessitent une concentration de proton plus faible que celle nécessaire à l'activation des récepteurs.

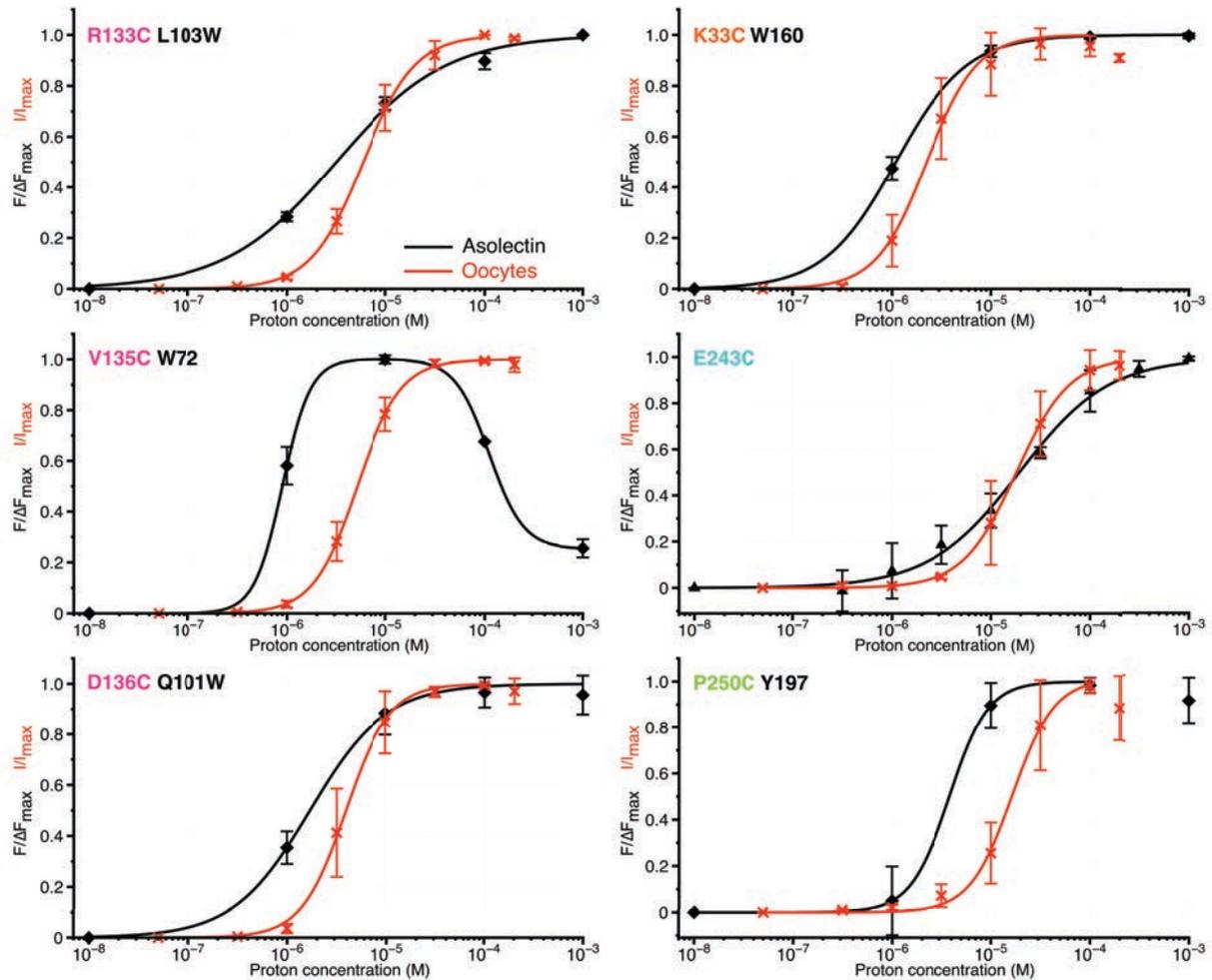


Figure 15: Comparaison des courbes doses-réponses en fluorescence et en fonction. Dans tous les panels, les données de fluorescence (noire) et d'électrophysiologie (rouge) ont été ajustées suivant l'équation de Hill et superposées pour chaque mutant principal. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Mutant	Electrophysiologie Non-marqués				Electrophysiologie Marqués au BBs				Fluorescence détergent			Fluorescence liposomes		
	pH50	nH	Imax	n	pH50	nH	Imax	n	pH50	nH	n	pH50	nH	n
C27S	5,31±0,07	1,6±0,2	7,0±0,4	5	5,3±0,1	1,7±0,2	7±2	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
R133C	5,3±0,2	1,8±0,1	7±3	4	5,1±0,2	2,14±0,05	8±3	3	5,4±0,3	1,7±0,6	5	5,5±0,1	1,3±0,2	3
R133C L103W	5,1±0,1	2,2±0,4	6,8±0,8	3	5,23±0,09	1,7±0,2	6±2	3	5,2±0,3	0,7±0,2	4	5,50±0,04	0,78±0,07	3
R133C Y23W	5,2±0,4	2,0±0,3	9,2±0,8	3	5,1±0,2	2,50±0,07	6±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
R133C Q101W	4,81	2,26	2,71	2	4,87	2,47	4,05	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V135C W72	5,6±0,2	1,7±0,3	7,0±0,9	4	5,29±0,08	2,0±0,1	7,2±0,7	3	6,31±0,09	1,7±0,2	7	6,05±0,02	3±1	4
V135C H ⁺	5,1	1,8	7,3	1	5,1±0,2	2,0±0,4	6,5±1,0	3	6,14±0,03	1,8±0,2	3	-	-	-
D136C	5,3±0,1	1,9±0,2	7,0±0,9	4	5,29±0,04	2,0±0,3	8,3±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D136C Q101W	5,17±0,08	2,3±0,1	8±2	3	5,4±0,2	2,2±0,3	9±3	3	5,85±0,08	0,96±0,08	4	5,8±0,1	1,3±0,6	3
D136C S93W	4,50±0,05	2,1±0,4	3±1	3	4,60±0,06	1,5±0,1	2,1±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D136C D178W	5,0	1,8	6,2	1	5,3	1,8	6,6	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K33C W160	5,88±0,03	1,8±0,1	9±2	3	5,6±0,2	1,8±0,4	8±2	3	6,22±0,03	2,0±0,4	4	5,95±0,07	1,25±0,09	6
K33C W160F	4,55±0,03	2,6±0,2	3,0±0,1	3	4,4±0,1	2,2±0,6	1±1	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A34C	5,3±0,3	1,8±0,1	6±1	4	4,7	1,8	5	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
A34C W160F	4,5	3,3	2,7	2	NF	NF	NF	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C	5,1±0,1	1,54±0,09	7,0±1,2	3	4,8±0,2	2,3±0,4	4,3±0,8	3	5,9±0,1	1,8±0,6	4	5,5±0,3	2,2±0,6	4
P250C Y197F	5,2±0,1	1,3±0,3	4,1±0,1	5	4,73±0,09	1,2±0,2	1,5±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C Y119F	4,6±0,2	2±1	3,0±0,3	3	4,5±0,3	2,1±0,7	2,2±0,3	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C W160F	NF	NF	NF	3	NF	NF	NF	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C Y194F	5,1±0,2	1,7±0,4	6,4±0,8	3	4,5±0,2	1,8±0,2	2±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C	5,1±0,1	1,7±0,3	8±1	4	4,7±0,2	1,7±0,3	5±4	3	4,5±0,2	2,0±0,2	4	4,8±0,1	0,9±0,3	6
E243C K33W	NF	NF	NF	4	NF	NF	NF	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C I201W	NF	NF	NF	1 0	NF	NF	NF	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C F238W	5,3±0,1	1,3±0,1	7,9±0,7	3	4,56	1,28	4,65	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C L241W	5,7±0,2	0,69±0,06	5,09±0,08	3	4,8±0,1	0,61±0,03	2±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C V242W	NF	NF	NF	4	NF	NF	NF	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA
T219C	5,4±0,2	1,6±0,1	7±1	3	NA	NA	NA	0	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Table 3: Dose dépendance des courants et de la fluorescence. Les valeurs de pH50 et nH sont obtenues par ajustement des courbes dose-réponse à l'équation de Hill. Le Imax représente le courant maximal enregistré. NF: non fonctionnel, indiqué lorsque le courant est inférieur à 500nA à la concentration maximale de proton. NA: non-applicable, indiqué lorsque les variations de fluorescence ne dépassent pas 10% sur la gamme de pHs testés. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

2.7 Enregistrements des variations de fluorescence en temps réel

Afin de suivre en temps réel les réorganisations structurales de GLIC, les variations de fluorescence des principaux couples de quenching, reconstitués en liposomes, ont été enregistrées sur un appareil à mélange rapide (stopped-flow), à pH8, 6, 5 et 4, et suivies au cours du temps. Pour tous les mutants, la fluorescence après 30s se situe dans les mêmes gammes que celle enregistrée en conditions d'équilibre (Table 4).

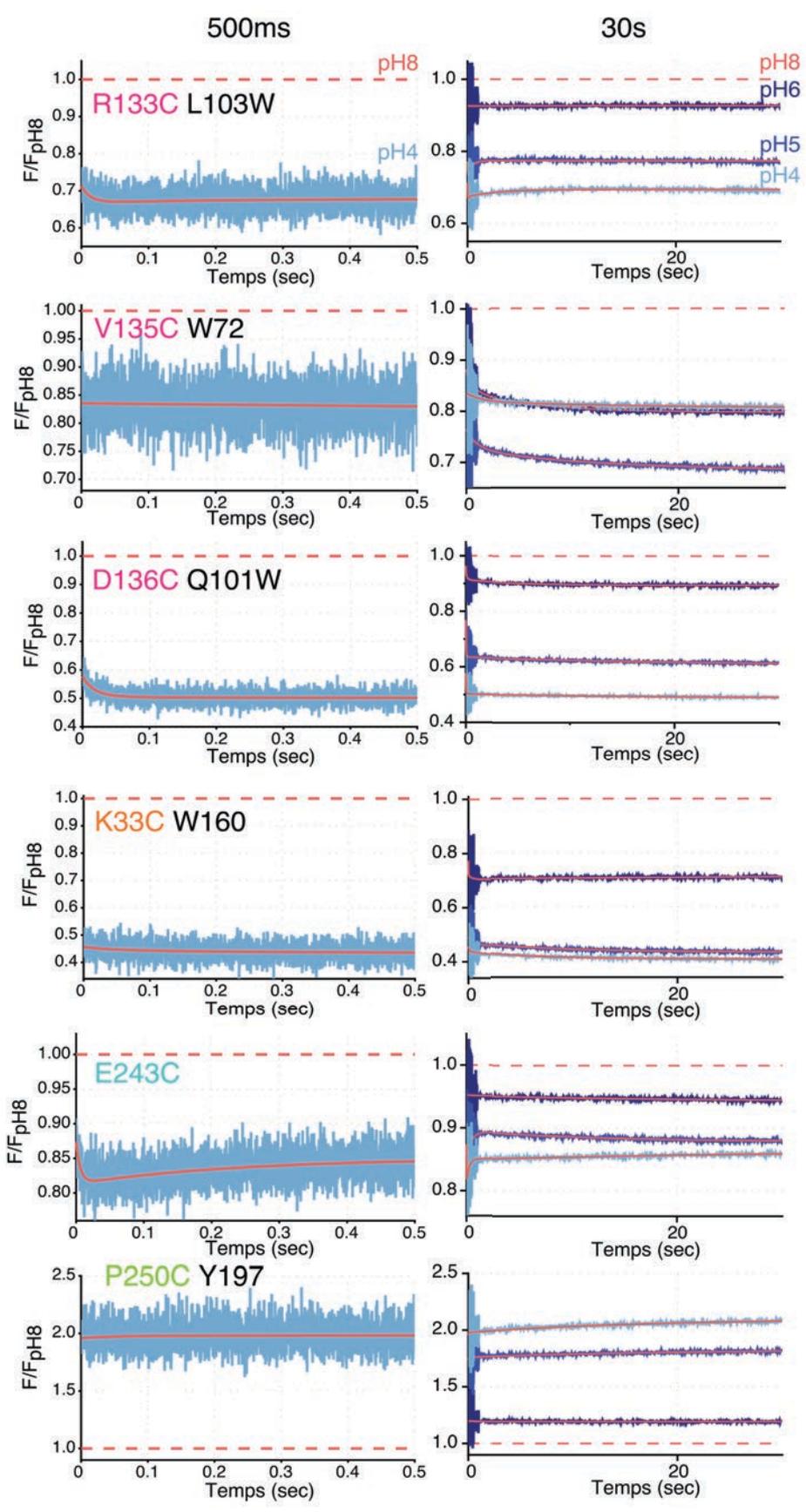
Mutant	pH	ΔF maximal à l'équilibre (%)	ΔF maximal après 30s (%)
R133C L103W	pH6	(-) 16±1	(-) 11±3
	pH5	(-) 41±1	(-) 28±9
	pH4	(-) 50±1	(-) 35
V135C W72	pH6	(-) 25±3	(-) 20±7
	pH5	(-) 43±2	(-) 29,9±0,9
	pH4	(-) 29±3	(-) 20±3
D136C Q101W	pH6	(-) 20±4	(-) 12±3
	pH5	(-) 49±3	(-) 43±4
	pH4	(-) 53±2	(-) 45±4
K33C W160	pH6	(-) 31±4	(-) 28±5
	pH5	(-) 61±3	(-) 55±4
	pH4	(-) 64±2	(-) 56±3
P250C W160	pH6	(+) 3±7	(+) 15±8
	pH5	(+) 46±9	(+) 60±20
	pH4	(+) 50±6	(+) 70±40
E243C	pH6	(-) 2±2	(-) 13±10
	pH5	(-) 7±2	(-) 19±8
	pH4	(-) 17,0±0,8	(-) 18±9

Table 4: Variations de fluorescence à l'équilibre et après 30s. Le tableau présente la variation maximale de fluorescence, pour chacun des mutants principaux, à pH6, 5 et 4. La première colonne regroupe les résultats obtenus par les mesures à l'équilibre, la deuxième colonne les résultats obtenus après 30s d'enregistrements en temps réel (stopped-flow). Le signe (-) indique une diminution de fluorescence et le signe (+) une augmentation. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Les traces de fluorescence obtenues ont été ajustées suivant une équation multi-exponentielle, en excluant les premières 3ms d'enregistrement qui montrent une importante variabilité, révélant que la

plupart des mouvements observés sont tri-phasiques. L'ensemble des constantes cinétiques de chacune de ces phases, pour tous les mutants et tous les pHs testés, ont ensuite été soumis à une analyse par « binning » permettant de définir trois grandes phases caractérisant les mouvements de GLIC : une phase rapide de 5ms à 24ms, une phase intermédiaire de 24ms à 385ms et une phase lente de 385ms à 30s (Figure 16 et 17A).

Figure 16 : Mesures en temps réel des variations de fluorescence. Chaque panel présente des traces typiques de fluorescence pour tous les mutants principaux à pH6, 5 et 4, avec un zoom sur les premières 500ms (gauche) ou la trace entière (droite). Sur chaque trace est représentée en rouge la résultante de l'ajustement suivant l'équation multi-exponentielle. Toutes les données sont normalisées par rapport à la fluorescence à pH8, pour comparaison, et le code couleur est identique dans chaque panel.



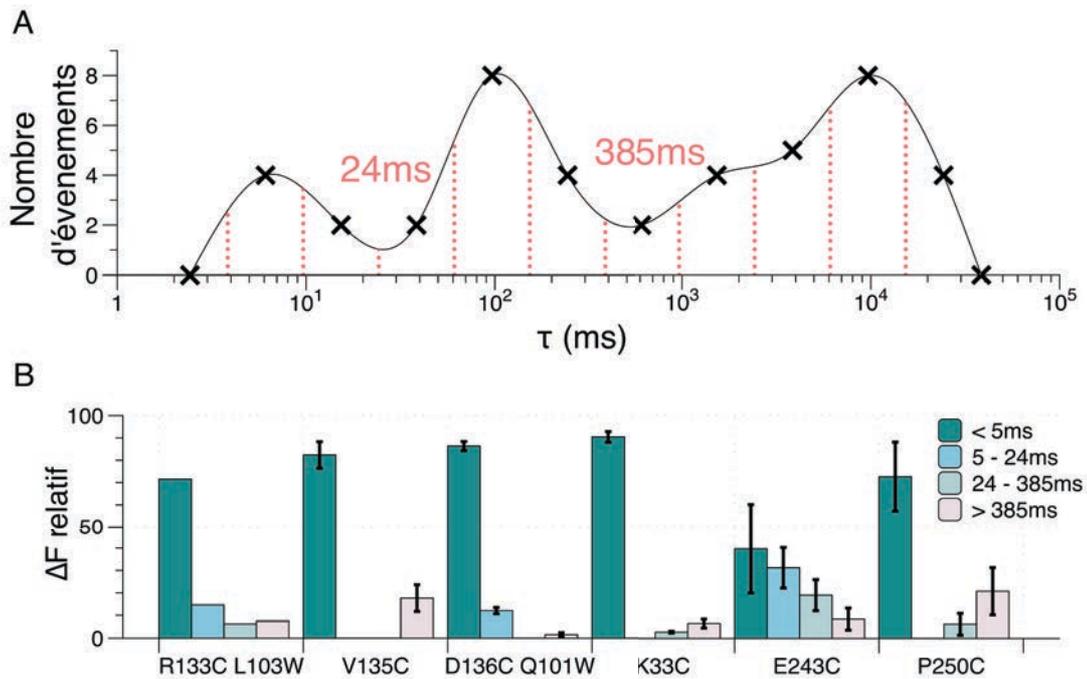


Figure 17 : Phases temporelles des réorganisations structurales. A : Graphique présentant la répartition des constantes cinétiques de tous les mutants et tous les pHs testés, après l'analyse par binning, avec un intervalle de 0,4. Chaque bin est représenté par les lignes pointillées rouges. B : Variations de fluorescence relatives à pH4 (calculées en % de la variation après 30s) pour chaque intervalle de temps déduit de l'analyse par bin. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

L'observation la plus marquante est que, pour la plupart des positions, la majorité des variations de fluorescence a lieu dans le « temps mort » (temps de mélange) de l'appareil (Figure 16), c'est à dire en moins de 2ms. Ces variations de fluorescence ultra-rapide ont été quantifiées à 5ms (2ms de temps mort + 3ms soustraites à l'analyse), montrant des variations de 70% et 90% pour les mutants mBBr33, 133, 135, 136 et 250 (Figure 17B et Table 5). Ainsi, les mouvements de rapprochement des positions 33-160, 133-103 et 136-101, ainsi que l'éloignement des positions 250-197, ont lieu avec des cinétiques très rapides.

Mutant	pH	Temps mort (<5ms)	Exponentielle 1		Exponentielle 2		Exponentielle 3		n
		ΔF relatif (%)	τ_1 (ms)	ΔF relatif (%)	τ_2 (ms)	ΔF relatif (%)	τ_3 (ms)	ΔF relatif (%)	
R133C L103W	pH6	(-) 94±6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4
	pH5	(-) 72±1	10±4	(-) 11,6±0,7	290±40	(+) 11±5	21'000±6'000	(-) 5±4	3
	pH4	(-) 72	12	(-) 15	345	(+) 6,3	9'800	(-) 7	2
V135C W72	pH6	(-) 53±9	50±40	(-) 12±4	700±400	(-) 17±6	3'000±1'000	(-) 19±4	6
	pH5	(-) 50±20	100±100	(-) 8±5	1'000±1'000	(-) 19±8	8'000±4'000	(-) 21±6	6
	pH4	(-) 82±6,0	700±400	(-) 8±2	30'000±40'000	(-) 9±6	NA	NA	4
D136C Q101W	pH6	(-) 40±30	9±4	(-) 30±10	100±10	(-) 10±10	2'900±600	(-) 14±7	4
	pH5	(-) 60±10	9±3	(-) 30±10	40±20	(-) 5±2	18'500±900	(-) 7±2	4
	pH4	(-) 86±2	11±3	(-) 12±1	4'000±5'000	1,6±0,9	NA	NA	4
K33C W160	pH6	(-) 73±9	9±5	(-) 19±9	100±100	(-) 6,1±0,7	3'000±4'000	(-) 3,2±0,6	3
	pH5	(-) 88,3±0,9	100±100	(-) 5±2	1'000±1'000	(-) 2,9±0,4	16'000±9,000	(-) 4±2	4
	pH4	(-) 90±2	100±100	(-) 2,8±0,4	2'000±2'000	(-) 3,6±0,8	10'000±2'000	(-) 4,1±0,5	3
P250C W160	pH6	(+) 90±10	300±500	(+) 10±10	NA	NA	NA	NA	4
	pH5	(+) 86±5	200±100	(+) 5±2	9'000±3'000	(+) 9±4	NA	NA	4
	pH4	(+) 70±20	100±100	(+) 6±5	6'000±5'000	(+) 20±10	NA	NA	4
E243C	pH6	(-) 80±20	8'000±10'000	(-) 8±7	12'000	(-) 20	NA	NA	4
	pH5	(-) 60±20	100±100	13±4	1'000±1'000	(+) 20±10	15'000±7'000	(-) 13±8	4
	pH4	(-) 40±20	5±1	(-) 32±9	150±20	(+) 19±7	14'000±7'000	(+) 9±5	4

Table 5: Constantes cinétiques et fluorescence des enregistrements en temps réel. Toutes les valeurs présentées dans cette table sont extraites de l'analyse des traces par équations multi-exponentielles. Les ΔF relatifs ont été calculés par rapport à la variation de fluorescence maximale à chaque pH. Dans le cas de variations de fluorescence bidirectionnelles, les amplitudes de chaque phase ont été additionnées pour déterminer la variation maximale. Le signe (-) indique une diminution de fluorescence et le signe (+) une augmentation. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

La position mBBr243 montre quant à elle un comportement différent. En effet, seule 40% de la variation de fluorescence est effectuée dans les premières 5ms, suivie par une variation de 30% dans la première phase rapide visible (Figure 17B). Seules deux autres positions, 133 et 136, montrent des variations de fluorescence dans cette phase rapide (5-24ms), mais elles ne comptent que pour 12% de la variation totale (Table 5). Ainsi, il apparaît que les mouvements effectués à la position mBBr243 sont plus lents que pour le reste du récepteur. De même, cette position montre 20% de variations de fluorescence au cours de la phase intermédiaire (24-385ms), alors que les variations aux positions mBBr33, 133 et 250 ne dépassent pas les 6% pour des temps similaires (Figure 17B).

Notons par ailleurs que les variations à la position 243 alternent entre diminution et augmentation de fluorescence, confirmant la complexité des réorganisations structurales dans cette région (Table 5).

Enfin, pour toutes les positions, des variations de fluorescence sont observées dans la phase lente (385ms-30s) avec des ΔF relatifs de faible amplitude, ne dépassant pas les 10% de la variation totale, à l'exception de la position mBBR250 (20%) (Figure 17B et Table 5). Les positions mBBR135 en haut de l'ECD, mBBR250 sur la boucle M2-M3 et mBBR243 sur les hélices M2 montrent les plus grandes variations indiquant qu'à ces régions, les récepteurs « continuent » les mouvements caractérisés par les enregistrements à l'équilibre, mais avec une plus faible amplitude.

2.8 Discussion

2.8.1 Description des réorganisations structurales de GLIC et comparaisons avec les structures connues

L'ensemble des données recueillies sur GLIC par la méthode de quenching induit par les tryptophanes, et les tyrosines, m'a permis de décrire différents mouvements effectués par le récepteur, libre des contraintes cristallines, en présence de concentrations croissantes d'agoniste.

Afin de comparer les données de fluorescence obtenues en solution, et les données de cristallographie obtenues sur des récepteurs figés, on peut construire un graphique comparant la quantité de quenching induit par la présence d'un tryptophane sur différentes positions d'insertion du mBBR, en fonction de la distance qui sépare les deux positions, mesurée sur les structures (Figure 18).

Ce graphique montre un bon accord général entre les valeurs de quenching et les distances mesurées, avec un fort quenching en dessous de 10Å et un faible quenching au dessus de 12Å.

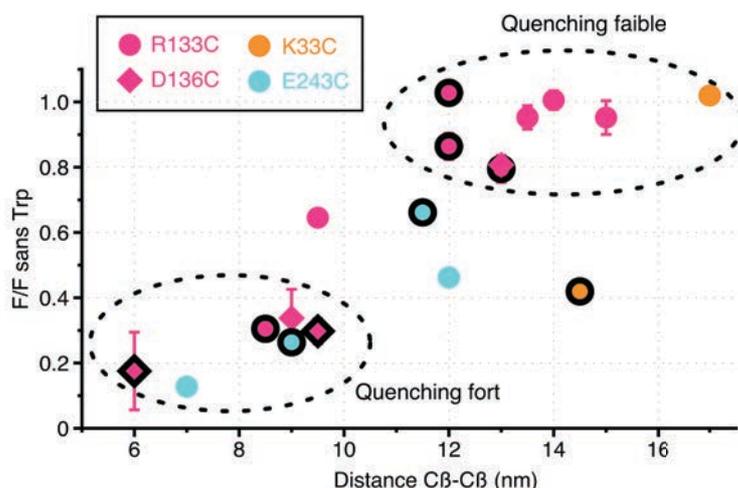


Figure 18 : Relation entre la distance et le quenching. Le graphique présente la fluorescence du mBBr suite à un quenching par divers tryptophanes adjacents (calculée telle que : F avec quencher/ F sans quencher) en fonction de la distance C β -C β séparant les deux positions (calculée sur les structures GLIC_{pH7} et GLIC_{pH4}). Les données obtenues à pH7 sont représentées par des symboles simples, et celles à pH4 sont surlignées en noir.

Mutant	$d_{\text{bimane-d}_{\text{trp}}}$ pH7 (Å)	F/F sans quencher pH7	$d_{\text{bimane-d}_{\text{trp}}}$ pH4 (Å)	F/F sans quencher pH4
R133C S44W	14	$1,01 \pm 0,03$	12	$1,03 \pm 0,04$
R133C Y23W	15	$0,95 \pm 0,05$	12	$0,86 \pm 0,04$
R133C Q101W	13,5	$0,95 \pm 0,04$	13	$0,79 \pm 0,04$
R133C L103W	9,5	$0,65 \pm 0,02$	8,5	$0,31 \pm 0,03$
V135C W72	10	$0,66 \pm 0,03$	10	$0,40 \pm 0,06$
D136C S93W	9	$0,34 \pm 0,09$	6	$0,2 \pm 0,1$
D136C Q101W	13	$0,81 \pm 0,02$	9,5	$0,30 \pm 0,04$
D136C D178W	14	$0,54 \pm 0,01$	10,5	$0,522 \pm 0,005$
K33C W160	17	$1,02 \pm 0,02$	14,5	$0,42 \pm 0,03$
A34C W160F	16	0,6	14	0,8
E243C I201W	14	$0,59 \pm 0,01$	8,9	$0,212 \pm 0,003$
E243C F238W	12	$0,462 \pm 0,007$	11,5	$0,662 \pm 0,003$
E243C L241W	7	$0,13 \pm 0,01$	9	$0,26 \pm 0,03$
P250C Y197	8	$0,60 \pm 0,05$	11	$0,93 \pm 0,04$

Table 6 : Distances et intensités de quenching. Les distances ont été mesurées sur les structures cristallographiques de GLIC à pH7 et à pH4 en utilisant uniquement les sous-unités A et B. Les valeurs de quenching ont été calculées comme suit : F en présence de quencher (Trp ou Tyr)/ F en absence de quencher. Toutes les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Cette répartition est particulièrement claire pour les positions mBBr133 et mBBr136. En effet, ces deux positions se situent sur la boucle B et les tryptophanes associés ont tous été insérés sur des brins β , l'ensemble de ces structures étant rigides. Ainsi, les variations de fluorescence à ces positions, et notamment pour les couples mBBr133-W103 et mBBr136-W101, représentent très probablement des mouvements quaternaires des deux sous-unités adjacentes se rapprochant, rappelant le mouvement de « un-blooming » décrit sur les structures (Figure 19). Notons que pour le couple mBBr136-W178, aucune variation de fluorescence n'a été enregistrée alors que l'étude des deux structures de GLIC, à pH7 et pH4, montre un rapprochement de ces deux positions de 3Å (Table 6). De plus, à pH7, les structures prédisent que les deux positions sont séparées de 13,8Å, distance à laquelle on ne s'attend pas à observer du quenching, en comparaison avec l'ensemble des données obtenues sur GLIC. Ainsi, les données de fluorescence montrent que, contrairement aux structures résolues de GLIC, la boucle C est toujours repliée sur l'ECD.

A la position mBBr135, l'impossibilité de substituer le W72 par une phenylalanine rend toute interprétation structurale plus délicate. Néanmoins, la résolution de la structure du mutant cystéine marqué au bimate indique clairement que les deux résidus (mBBr135 et W72) sont assez proches pour qu'il y ait un quenching. En effet, les C β de C135 et W72 sont séparés de 10,4Å, mais plus encore, le noyau indole du tryptophane est à 3,2Å du bimate. Ainsi, on peut proposer que, le bimate pointant vers l'interface entre les deux sous-unités adjacentes, la contraction du domaine extracellulaire pousse le mBBr vers le tryptophane 72 (Figure 7). L'augmentation de fluorescence à plus bas pH n'est, quant à elle, pas compatible avec les structures connues de GLIC. Cependant, on peut proposer qu'à forte concentration d'agoniste, le mouvement de rotation initié par l'ECD au cours de l'activation, continue permettant ainsi de libérer la chaîne latérale 135 dans le vestibule et de l'éloigner du W72. Enfin, au niveau de la boucle 2, les variations de fluorescence du couple mBBr33-W160 montrent que les deux positions se rapprochent lors de l'activation, ceci pouvant s'apparenter à une contraction des deux feuillets β de l'ECD entraînant le rapprochement des deux-positions, de part et

d'autre de l'interface entre sous-unités (Figures 8 et 19). La comparaison avec les structures de GLIC montre qu'on peut également y observer un rapprochement des deux positions, toutefois la distance à laquelle on observe le plus de quenching en solution (pH4) est de 14,6Å, distance au delà de la limite de quenching déduit des positions précédentes (Figure 18, 19 et Table 6). De même, le tryptophane 160 induit un quenching quasiment total sur la position mBBr34 alors que les deux positions ? sont séparées de 15Å à pH7 (Table 6). Le tryptophane se situant au fond d'une cavité, il est possible que cet environnement particulièrement anisotrope force une conformation particulière, ou plus étendue des cystéines+bimane. Toutefois, il est également possible que les conditions de cristallisation de GLIC forcent des conformations locales où ces deux régions sont plus éloignées qu'elles ne le sont en solution.

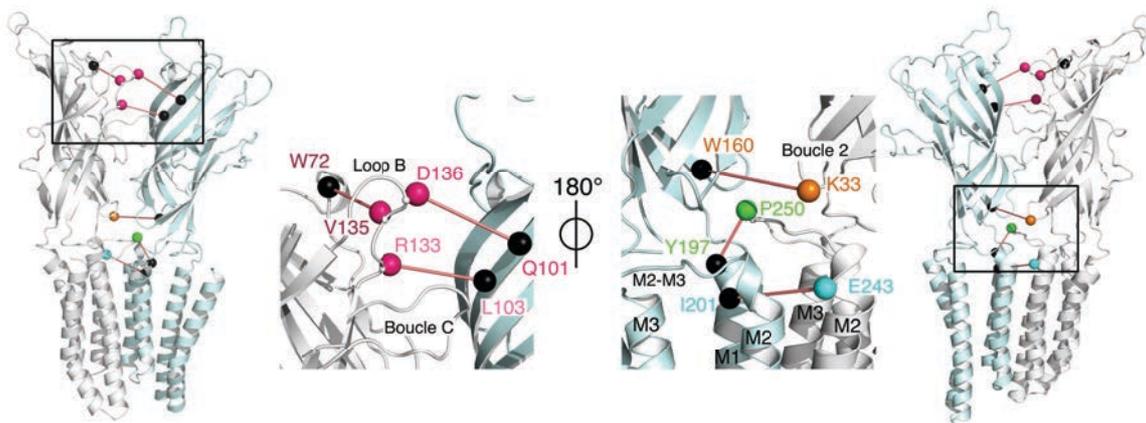


Figure 19 : Couples de quenching principaux. Vue globale et zoomée de la structure GLIC pH7, représentant seulement deux sous-unités. Les structures de gauche sont vues de l'extérieur du récepteur et les structures de droite, de l'intérieur. Toutes les paires de quenching sont représentées par une sphère, colorées pour la mutation en cystéine et la liaison du bimane, et en noire pour les quenchers correspondants. Toutes les paires sont annotées par la même couleur et liées par une ligne rouge.

Au niveau de l'interface entre l'ECD et le TMD, on a pu observer l'effet de multiples tyrosines sur la fluorescence de la position mBBr250. Les positions W160 et Y194 ont un impact similaire à tous les pH, ce qui est en accord avec les structures cristallographiques qui montrent qu'ils sont toujours à moins de 10Å du mBBr250, valeur à laquelle on s'attend à voir

un fort quenching. Pour la tyrosine 119, sa mutation en phénylalanine montre qu'elle agit comme quencher de la fluorescence du mBBR250 aux hauts pH, mais sa participation à l'augmentation de fluorescence aux bas pH est difficile à définir. De plus, elle apparaît très éloignée du mBBR, selon les structures cristallographiques, avec des distances allant de 13Å à 16Å, ainsi il semble plus probable que son impact sur les variations de fluorescence à cette position se fasse par l'altération des positions des autres quenchers. Enfin, la mutation de la tyrosine Y197 montre qu'elle est principalement responsable des variations de fluorescence du mBBR250 et ainsi que les deux positions s'éloignent au cours de l'activation de GLIC. Cette conclusion est en fort accord avec les structures qui montrent un mouvement vers l'arrière de la boucle M2-M3, éloignant par là même, la position 250 du pré-M1 et donc de la tyrosine 197 (Figure 19).

Pour ce qui est de la position mBBR243, il est difficile de proposer des hypothèses de réorganisations structurales, la plupart des tryptophanes insérés impliquant une perte de fonction des récepteurs, et dans tous les cas ne montrant pas de variations de fluorescence, donc pas de mouvement relatif des sondes, lors de l'application d'agoniste. Toutefois, une position fait exception, l'insertion d'un tryptophane au sein de l'hélice M1 à la position I201 induit une forte diminution de fluorescence de la position mBBR243, cette diminution étant renforcée par l'application de protons. Ainsi, ces données montrent que les deux positions se rapprochent, ce qui peut s'apparenter à un mouvement vers l'arrière du haut de l'hélice M2 ou un mouvement vers le pore de l'hélice M1 (Figure 19). Cette observation est encore une fois en remarquable accord avec les structures cristallographiques qui montrent que la distance séparant ces deux positions passe de 14Å à pH7, à 8Å à pH4. Ce double-mutant de GLIC n'étant pas fonctionnel, on peut tout de même souligner que la position ciblée (19') se situe bien au dessus de la « porte » d'activation en 9' et que le mouvement décrit n'est donc pas forcément relié à l'ouverture du pore. Il est également intéressant de noter que ce mouvement est observé pour une quantité de proton 10 fois inférieure à celle nécessaire pour observer le mouvement de l'hélice M2 seule, et ce à la fois en

détergent et en liposomes (Figure 12). Ainsi, on peut spéculer que les réorganisations observées à travers ce couple de quenching, ont lieu indépendamment de l'ouverture du pore et peuvent représenter un intermédiaire de pré-activation, stabilisé aux basses concentrations d'agoniste.

D'autres positions suivies en fluorescence, sur le récepteur en liposome, montrent une différence entre la concentration d'agoniste nécessaire pour effectuer le mouvement et celle nécessaire à l'ouverture du pore, telle que mesurée en cellules eucaryotes. Pour les positions mBBR135 et mBBR250 cette différence s'élève à $\Delta\text{pH}=0,8$ et $0,7$ respectivement, ainsi que, dans une moindre mesure, $\Delta\text{pH}=0,4$ pour la position mBBR136-W101 (Figure 15). Ces différences suggèrent l'existence d'un intermédiaire structural, stabilisé à faible concentration d'agoniste, où le domaine extracellulaire est contracté, la boucle M2-M3 vers l'arrière et le haut de l'hélice M2 rapproché de l'hélice M1.

Notons toutefois qu'il est délicat de comparer des données obtenues en liposomes et en ovocytes de Xénope, car il a été rapporté que la fonction de GLIC est affectée par la reconstitution en liposomes. Les récepteurs sont toujours fonctionnels mais nécessitent une application plus importante d'agoniste pour stabiliser un état actif, leur pH_{50} étant de 2,9 dans le cas le plus extrême (Dellisanti et al., 2013a; Labriola et al., 2013; Velisetty and Chakrapani, 2012c), une concentration de plus de deux ordres de grandeur supérieure à celle observée pour GLIC exprimé en cellules eucaryotes ($\text{pH}_{50}=5,3$). Ainsi, si l'on compare le pH_{50} fluorescence et le pH_{50} électrophysiologie pour des récepteurs en liposomes, cette différence entre mouvements et stabilisation d'un état actif est d'autant plus importante.

Il serait ainsi très intéressant de réaliser des enregistrements électrophysiologiques, sur liposomes, des mutants présentés dans cette étude afin d'effectuer une comparaison directe entre réorganisations et fonction, et décrire plus précisément cet intermédiaire de « basse concentration ».

Ainsi on a pu voir que les données obtenues dans et hors cristal sont en bon accord pour décrire les transitions de GLIC. On peut ainsi proposer dans un modèle général que l'activation des récepteurs s'effectue par une contraction du domaine extracellulaire, un mouvement vers l'arrière de la boucle M2-M3 ainsi qu'un mouvement, également vers l'arrière, des hélices M2.

Notons cependant, que les mesures réalisées en solution pointent vers des différences, au niveau local, par rapport aux structures connues de GLIC. Notamment la position de la boucle C toujours repliée sur le domaine extracellulaire, et les distances entre feuillet interne et feuillet externe qui apparaissent plus faibles en solution que dans le cristal.

2.8.2 Insensibilité de GLIC à son environnement membranaire

Une conclusion importante de ce travail est que les réorganisations structurales observées en détergent sont remarquablement conservées sur les récepteurs reconstitués en liposomes. Notons toutefois deux exceptions aux positions mBBR33-W160F et mBBR-243. Comme discuté dans la partie résultat, ces deux positions se situent à proximité du pore de GLIC et ainsi du groupe de détergents présents dans cette région. Le retrait des détergents lors de la reconstitution en liposomes peut ainsi largement impacter la fluorescence du bimané, qui est particulièrement sensible à l'hydrophobicité de son environnement, sans que ces variations rendent compte d'un réel mouvement au sein des récepteurs. Il est également envisageable que, dans un environnement plus physiologique, certains des mouvements observés en détergent ne soient pas exactement similaires à ceux effectués par les récepteurs au sein d'une membrane. Toutefois, les différences discutées ici sont minimes et l'ensemble des données montre que les réorganisations structurales décrites sont fortement conservées entre détergent et liposomes. Cette observation est particulièrement marquante car il est connu que les RCPs sont sensibles à leur environnement membranaire, et notamment à la présence de certains lipides. C'est le cas notamment du nAChR dont la fonction est dépendante de la présence de cholestérol et de lipides

anioniques (daCosta et al., 2013; Martinez et al., 2002). Il a d'ailleurs été montré qu'en absence de ces lipides le récepteur nicotinique, tout comme le récepteur procaryote ELIC, adoptent une conformation découplée, montrant une faible affinité pour le ligand mais incapable de transiter vers l'état actif, dans laquelle les hélices M4 se « détachent » du récepteur vers la membrane (daCosta et al., 2013). Les études réalisées sur GLIC reconstitué en liposomes ne montrant pas les mêmes évidences de stabilisation d'un état découplé, il a été proposé qu'un groupe de résidus hydrophobes (tryptophanes et leucines), en haut des hélices M4 et M1, participe à la stabilité du TMD de GLIC (Carswell et al., 2015; Hénault et al., 2015). La similarité des données obtenues en détergent et en liposomes permet de proposer que cette stabilité du TMD est également effective en détergent.

Mais plus encore, la similarité des données détergent/lipides permet de valider les caractérisations précédentes effectuées sur GLIC solubilisé en détergent comme représentatives du comportement du récepteur au sein d'une membrane lipidique.

2.8.3 Evidences de l'existence d'un intermédiaire de pré-activation

Enfin, les enregistrements effectués en temps réel sur GLIC reconstitué en liposomes nous ont permis de proposer un modèle temporel des réorganisations de GLIC au cours de l'activation et la désensibilisation. En effet, des mesures électrophysiologiques effectuées par patch-clamp en conformation outside-out rapportent, pour GLIC, un $T_{\text{activation}}$ de 30ms à 150ms et un $T_{\text{désensibilisation}}$ de 200ms à 10s (Laha et al., 2013). L'analyse des données obtenues en stopped-flow indique que pour les positions mBBR33-W160, mBBR133-W103, mBBR136-W101 et mBBR250-Y197 plus de 70% de la variation de fluorescence, et donc du mouvement, ont été effectués en moins de 5ms, bien avant l'activation des récepteurs. A l'inverse, la position mBBR243 ne montre que 40% de variations de fluorescence sur ces mêmes temps, avec 60% des variations relatives de fluorescence ayant lieu pendant la première phase rapide visible et la phase intermédiaire. Ces phases temporelles (5-385ms) étant dans la

gamme des cinétiques mesurées pour l'activation de GLIC, les mouvements suivis à la position mBBR243 sont très probablement reliés à l'ouverture du pore. Ainsi les données de fluorescence en temps réel montrent l'existence d'un intermédiaire structural au cours de la transition repos vers actif où la contraction du domaine extracellulaire et le mouvement vers l'extérieur de la boucle M2-M3 sont effectués en quelques millisecondes, alors que le pore du récepteur est toujours fermé (Figure 21).

Ce modèle permet d'ailleurs d'expliquer les données obtenues à l'équilibre sur les mutants « perte de fonction » qui montrent tout de même des variations de fluorescence, notamment aux positions mBBR250-W160F et mBBR243-I201W. En effet, on peut proposer que, dans cet état de pré-activation, le haut de l'hélice M2 a également effectué un mouvement et s'est rapproché de l'hélice M1 de la même sous-unité.

Différentes mutations réalisées sur GLIC ont abouties à la résolution de structures présentant une nouvelle conformation du récepteur, dénommée LC pour locally-closed (Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2012; Sauguet et al., 2014). Cette conformation particulière montre un ECD contracté, donc type « actif », avec un TMD fermé, c'est à dire type « repos ». De plus, la boucle M2-M3 adopte plusieurs conformations suivant le mutant cristallisé, permettant de classer les conformations LC en trois catégories LC1, LC2 et LC3. La conformation LC2, obtenue par insertion d'une proline à la position 19' (E243P) ou un pont disulfure entre la boucle 2 et la boucle M2-M3 (C33-C245), montre une boucle M2-M3 déplacée vers l'arrière, c'est à dire de type « actif ». Ainsi, la conformation LC2 avec un ECD contracté, une boucle M2-M3 vers l'arrière et un pore fermé, pourrait présenter un bon modèle structural de l'état intermédiaire de pré-activation présenté ci-dessus.

Pour tester cette hypothèse, j'ai réalisé des enregistrements, en conditions d'équilibre, de différents récepteurs marqués au mBBR et portant la mutation (H11'F) stabilisant la conformation LC1, la conformation LC2 n'étant obtenue que par des mutations aux sites d'insertion du bime

qu'il n'est pas possible d'étudier directement. Aux positions mBBR135-LC et mBBR250-LC, les variations de fluorescence sont similaires à celles observées pour les simples mutants mais avec des amplitudes significativement plus faibles. Plus encore, la fluorescence du mutant mBBR33-LC est superposable à celle du simple mutant mBBR33 (Figure 20). Ces observations suggèrent que 1) le blocage des récepteurs dans la conformation LC permet tout de même d'observer des réorganisations structurales en accord avec l'idée d'un intermédiaire de pré-activation similaire en structure à la conformation LC, 2) les réorganisations décrites aux positions 135 et 250 ne sont pas « totales » lorsque les récepteurs sont stabilisés et potentiellement bloqués à bas pH dans l'état LC. Cette seconde observation est particulièrement intéressante car, dans les enregistrements en temps réel, les positions mBBR135 et mBBR250 montrent toutes les deux 20% de variations relatives de fluorescence sur les phases longues (385ms-30s), indiquant que la contraction de l'ECD et le mouvement vers l'arrière de la boucle M2-M3 continuent au cours de l'activation et probablement de la désensibilisation (Figure 21).

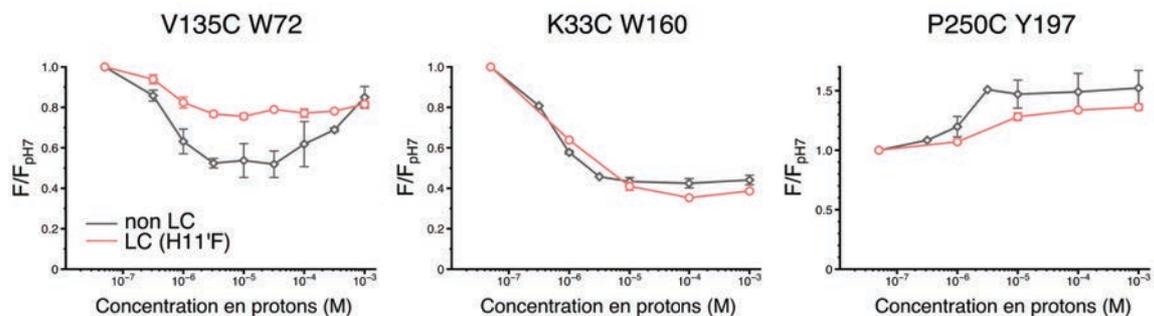


Figure 20 : Variations de fluorescence en présence de la mutation H11'F (LC). Les trois panels présentent les variations de fluorescence de mBBR135, mBBR33 et mBBR250 avec (rose) ou sans (gris) la mutation H11'F entraînant une stabilisation de l'état LC de GLIC. Toutes les valeurs sont normalisées sur l'intensité de chaque mutant à pH7,3. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Notons cependant que la conformation LC2 est une approximation structurale du réel état pré-actif. En effet, les études de fluorescence suivant le rapprochement du haut de l'hélice M2, formant le pore, et de l'hélice M1 montrent que ce mouvement est effectué alors que le pore

n'est pas ouvert, ce rapprochement n'étant pas vu dans la conformation LC2. Ainsi, une description plus réaliste de l'état de pré-activation engloberait l'ensemble de l'ECD, l'interface ECD/TMD et le haut du TMD dans une conformation type active. Cette description est rejointe par les analyses par REFER effectuées sur le récepteur nicotinique indiquant que le haut des hélices M2, et particulièrement la position 19', jusqu'à la position 14' (sous la 1ère barrière hydrophobe du pore), bougent « tôt » dans la transition vers l'état actif, la position 9' (2ème barrière hydrophobe) bougeant quant à elle « tard » (Purohit et al., 2013, 2007).

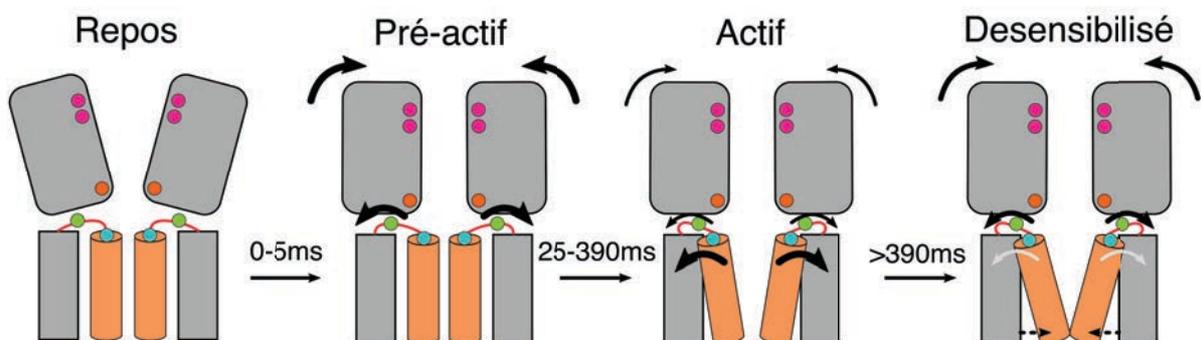


Figure 21 : Schéma de transitions allostériques de GLIC. Ce schéma est basé sur les données obtenues par les enregistrements en temps réel, dont les différentes phases temporelles sont indiquées. La taille des flèches rends compte de l'amplitude de fluorescence mesurée, et donc de l'amplitude du mouvement.

L'intermédiaire structural de pré-activation décrit dans cette partie montre ainsi un domaine extracellulaire contracté et la boucle M2-M3 déplacée vers l'arrière (Figure 21). De façon intéressante, deux études des récepteurs GlyR et nAChR en canaux uniques ont identifié l'existence d'états intermédiaires, au cours de l'activation, nommés Flip et Primed, respectivement. Ces états n'ont pas été caractérisés structurellement mais ils ont la particularité de présenter une plus haute affinité pour l'agoniste que l'état de repos mais avec un pore fermé, suggérant des réorganisations au sein de l'ECD, idée confirmée par la réalisation de mutations sur le nAChR (Burzomato et al., 2004; Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009). De plus, une étude extensive par analyse de valeurs de ϕ réalisée sur le nAChR, indique que les réorganisations au

sein de l'ECD et de la boucle M2-M3, notamment à la position équivalente à P250 chez GLIC, sont effectuées très tôt dans la transition vers l'état actif, rejoignant ainsi les conclusions de mon travail de thèse (Purohit et al., 2013).

Ainsi, la méthode de quenching induit par les tryptophanes et les tyrosines, développée sur GLIC au cours de ma thèse, fournit l'opportunité de suivre directement les états fonctionnellement silencieux et permet de développer un modèle structural, établi sur des récepteurs non-contraints, pouvant s'appliquer à l'étude des RCPs eucaryotes.

2.8.4 Réorganisations structurales au cours de la désensibilisation

La plupart des positions suivies dans les enregistrements en temps réel montrent des variations de fluorescence sur les temps longs (de 385ms à 30s) qui sont dans la gamme des constantes cinétiques décrites pour la désensibilisation de GLIC. Plus particulièrement, les positions V135 et P250, et dans une moindre mesure E243, effectuent des mouvements au cours de cette phase. Toutefois, pour toutes les positions étudiées, ces variations de fluorescence ne représentent pas plus de 20% de la variation totale et indiquent donc que les mouvements ayant lieu au cours de la désensibilisation sont de faibles amplitudes à ces positions (Figure 21). Cette idée est en accord avec différentes études réalisées sur GLIC, en RPE, et d'autres RPCs, par mutagenèse et RMN, qui proposent que la désensibilisation implique principalement une contraction de la partie basse du canal (Gielen et al., 2015; Kinde et al., 2015; Velisetty et al., 2012b). De plus, la structure récente du récepteur β 3GABA_A, supposée être de l'état désensibilisé, montre une conformation inédite du pore avec un point de constriction au niveau des résidus -2' en bas du pore (Miller and Aricescu, 2014). L'ensemble de ces données suggère un modèle de la désensibilisation où la réorganisation majeure se situerait en bas du pore, accompagnée de réorganisations de moindre amplitude au sein de l'ECD et de la boucle M2-M3.

Notons toutefois que la position mBBR250 se situe à l'extrémité C-terminale de la boucle M2-M3, proche du pré-M1. Or, des expériences de

VCF réalisées sur le récepteur glycine ont identifié le pré-M1 comme une région effectuant des réorganisations lors de la désensibilisation (Wang and Lynch, 2011b). De plus, les mutations de résidus tyrosine autour du mBBr250 ont montrées que les tyrosines situées sur l'hélice M1 et le pré-M1 avaient un impact sur la fluorescence à cette position. Ainsi, on peut proposer que les variations de fluorescence observées sur les temps longs à la position mBBr250 ne sont pas nécessairement le résultat d'un mouvement de la boucle M2-M3 mais peuvent résulter de réorganisations au sein du pré-M1.

2.9 Perspectives

L'impossibilité de visualiser les premières 2ms d'enregistrement limite les interprétations des données en temps réel. En effet, il serait très intéressant de voir si la majeure partie des réorganisations (au moins 70% des variations de fluorescence) représente en fait un ou plusieurs mouvements, et quelles sont les constantes cinétiques réelles de ces évènements de pré-activation.

Pour répondre à ces questions, nous avons démarré des expériences de « Temperature-Jump » (en collaboration avec D. Poerschke à l'Institut Max Planck). Cette technique est beaucoup utilisée, en biologie, pour suivre le repliement des protéines ou leur liaison avec un ligand. Toutefois, de part sa haute résolution temporelle, elle est également employée pour suivre la dynamique des protéines et suivre leurs changements conformationnels en temps réel (Guzman et al., 2015; Kwon et al., 2011). Le principe de cette technique est de perturber l'équilibre entre deux états, par exemple entre l'état de repos (R) et l'état actif (A), par un changement quasi-instantané de température, et de suivre la relaxation du système par fluorescence. Le saut de température étant très rapide, dans notre cas 2 μ s, cette technique permettra sans nul doute de résoudre les évènements précoces durant l'activation de GLIC.

De plus, il serait intéressant d'enregistrer, par stopped-flow, les mutants marqués au mBBr et portant une mutation stabilisant la conformation LC. En comparant ces enregistrements à ceux obtenus sur les récepteurs libres de stabiliser toutes les conformations on pourrait peut-être confirmer que les mouvements précoces sont ceux de l'entrée dans un état type « locally-closed ».

Il serait également très intéressant d'étendre les études faites sur les récepteurs en détergent et en liposomes, à des récepteurs exprimés à la membrane de cellules. Non seulement ces études permettraient de comparer les mouvements observés entre différents environnements membranaires, mais surtout, en couplant la détection de fluorescence à l'enregistrement de courants à la membrane, il serait possible de faire un parallèle direct entre structure et fonction des récepteurs. Cette technique de patch-clamp fluorométrie (PCF) a déjà été appliquée à l'étude d'un récepteur-canal aux nucléotides cycliques, à partir de membranes d'ovocytes et avec le fluorophore mBBr, mais jamais encore à l'étude des RCPs (Islas and Zagotta, 2006). Les techniques actuelles se basent principalement sur l'utilisation de gros fluorophores ne permettant pas une description structurale des réorganisations. Plus particulièrement, cette méthode permettra l'étude des états fonctionnellement silencieux des récepteurs, c'est à dire les mutants « perte de fonction » ou encore l'étude de composés antagonistes (stabilisant une conformation avec un pore fermé). En effet, tous les états ayant un pore fermé, ou incapable de transloquer les ions, ne sont pas allostériquement équivalents.

Ces rapporteurs fluorescents, autant sur les récepteurs en détergent/liposomes que sur les récepteurs à la membrane de cellules, pourront également être utilisés pour des cribles à grande échelle de composés. En effet, en comparant la fluorescence de deux positions, par exemple en haut de l'ECD et sur les hélices M2, qui sont rapportrices d'états différents, on pourra sélectionner et classer des composés, selon l'état allostérique stabilisé.

Mais surtout, l'évolution naturelle de cette technique, est son application aux RCPs eucaryotes. Il n'est, bien sur, par certain que les récepteurs-canaux eucaryotes puissent « supporter » autant de mutations que GLIC, mais la cartographie présentée ici permet déjà d'identifier de multiples sites permettant de suivre les réorganisations structurales. Le transfert de cette méthode aux autres récepteurs de la famille serait très intéressant afin d'étudier, non seulement les transitions allostériques de récepteurs humains, mais également de suivre la similarité, ou non, de ces mouvements entre les quatre grandes classes de récepteurs, nicotiniques, sérotonine, glycine et GABA.

De plus, la plupart des couples de quenching mettent en jeu un site de fixation du mBBr et un tryptophane/tyrosine situés de part et d'autre des interfaces entre sous-unités. La comparaison de données de fluorescence obtenues sur des récepteurs homomériques et sur des récepteurs hétéromériques pourrait permettre d'identifier et de quantifier les réorganisations asymétriques, si celles-ci existent au sein des RCPs hétéromères.

3. Projet 2 : Identification d'une région critique pour l'activation et la désensibilisation de GLIC

3.1 Préface

Cette partie regroupe mes résultats obtenus sur l'identification d'une région charnière pour l'activation et la désensibilisation de GLIC.

L'étude de la désensibilisation de GLIC est un projet sur lequel j'ai travaillé dans les débuts de mon séjour au laboratoire et plus récemment repris avec l'identification de nouveaux mutants. La plupart des expériences présentées ici sont donc encore préliminaires et n'ont pas toutes été finalisées. Néanmoins, ces études ont permis de mettre en avant certains phénotypes intéressants qui seront donc présentés.

De plus, au fil des diverses caractérisations électrophysiologiques de mutants de GLIC, j'ai pu identifier une région importante pour l'activation des récepteurs, le pré-M1. L'étude de cette région a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Marc Delarue à l'institut Pasteur, et plus particulièrement Haidai Hu et Reinis Renolds Ruza qui ont résolu les structures de GLIC présentées ici.

3.2 Introduction

Alors que les états de repos (R) et actifs (A) sont essentiels à l'activation provoquée par les neurotransmetteurs et donc à la transmission synaptique, le rôle physiologique de la désensibilisation (D) reste peu connu. Néanmoins, la désensibilisation est une propriété quasi universelle des pLGICs, et contribue probablement à la forme des courants post-synaptiques et à la protection des synapses suite à des activations répétées (Auerbach and Akk, 1998; Jones and Westbrook, 1996). De plus, certains médicaments et drogues, tels que la nicotine, sont administrés de façon prolongée (contrairement au pulse de neurotransmetteur transitoirement présent à la synapse), très probablement provoquant une désensibilisation importante de récepteurs (Giniatullin et al., 2005; Quick and Lester, 2002).

Le récepteur-canal GLIC a été le premier récepteur cristallisé en présence d'agoniste (Bocquet et al., 2009). La cristallisation implique que les récepteurs soient équilibrés avec l'agoniste, et donc certains auteurs ont proposé que la conformation observée correspondrait à l'état désensibilisé, l'état actif étant généralement transitoire. Cependant, plusieurs arguments suggèrent fortement que la structure de GLIC_{pH4} ne représente pas un état désensibilisé : 1) les expériences de dynamique moléculaire montrent que la géométrie du pore est compatible avec le passage d'ions et donc avec une conformation active, 2) la structure du GluCl α obtenue en présence de trois effecteurs stabilisant l'état actif, le glutamate, l'ivermectine et la picrotoxine, est très similaire à GLIC_{pH4} au niveau du pore, 3) les mesures de distances, effectuées par DEER, entre régions du récepteur désensibilisé sont très différentes des mêmes mesures réalisées sur la structure GLIC_{pH4} (Dellisanti et al., 2013a; Hibbs and Gouaux, 2011; Sauguet et al., 2013c).

La résolution de la structure de GLIC en l'absence d'agoniste, à pH7,3, a permis de proposer un modèle général d'activation du récepteur (Sauguet et al., 2014). Ce modèle est décrit dans l'introduction partie 4.3 mais on

peut rappeler les mouvements majoritaires observés : au cours de l'activation, le domaine extracellulaire du récepteur effectue un mouvement de contraction décrit par deux composantes 1) un mouvement vers l'intérieur de l'ECD de chaque sous-unité, décrit par le terme « un-blooming », 2) un mouvement de rotation de l'ECD de chaque sous-unité résultant en une rotation globale du domaine extracellulaire. Au niveau de l'interface entre l'ECD et le TMD et du TMD, le haut de l'hélice M2 ainsi que la boucle M2-M3 effectuent un mouvement marqué de translation vers l'extérieur de la protéine, de concert avec l'ouverture du pore. De plus, la région du haut de M1 et du pré-M1, qui constitue le pont covalent entre l'ECD et le TMD, effectue un mouvement de bascule vers l'intérieur de la protéine comme indiqué dans la figure 1. Les interactions entre ces deux régions semblent donc jouer un rôle important dans le couplage entre l'ECD et le TMD. J'ai donc exploré cette région par mutagenèse, montrant des phénotypes robustes d'altération de l'activation et aussi, de façon remarquable, de désensibilisation.

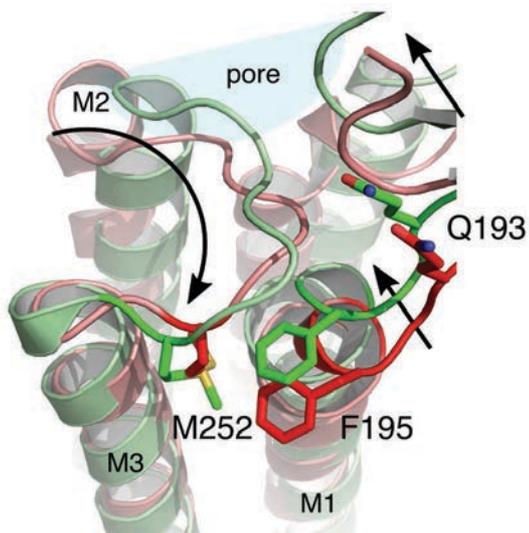


Figure 1 : Positions étudiées pour la caractérisation du rôle du pré-M1 dans l'activation. Les flèches représentent les mouvements déduits de la comparaison entre les structures à pH7 (rouge) et pH4 (vert).

3.3 Identification d'une région charnière pour l'activation de GLIC

3.3.1 Caractérisations fonctionnelles

L'analyse des structures GLIC_{pH7} et GLIC_{pH4} révèle une interaction entre les résidus F195 situé en haut de M1 et M252 située sur la boucle M2-M3 (Figure 1).

La mutation F195A résulte en un phénotype perte de fonction fort avec des courants à la membrane ne dépassant pas 1µA contre 8µA pour le récepteur sauvage (Figure 2 et Table 1). Notons que les faibles courants observés à bas pHs peuvent être dus à l'activation de canaux endogènes des ovocytes, régulièrement observés sur des ovocytes non injectés. Ainsi, il est possible que le mutant Y195A ne produise en réalité aucun courant à la membrane.

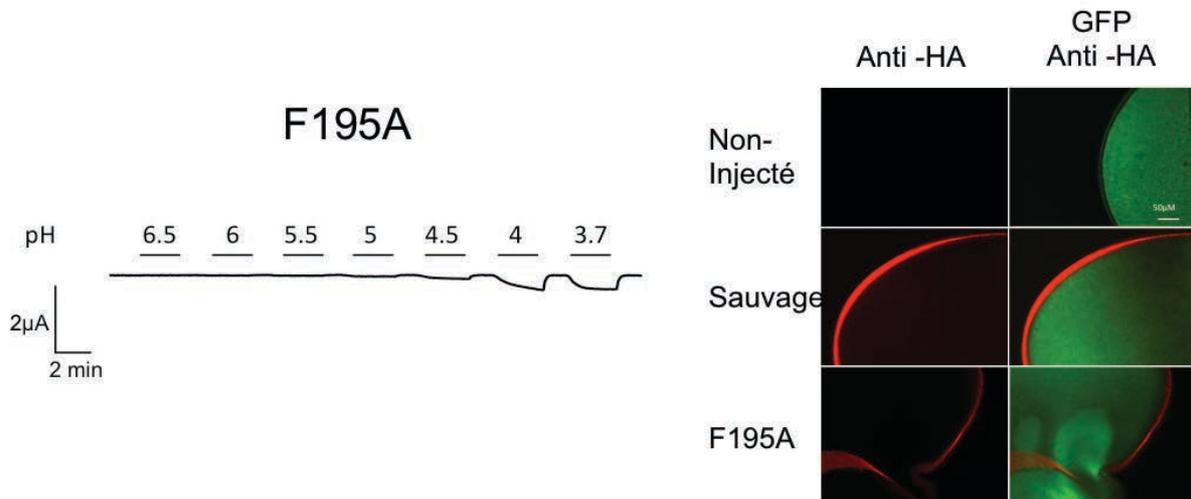


Figure 2 : Caractérisations du mutant F195A. Gauche : Tracé électrophysiologique du mutant. Droite : Clichés de microscopie à fluorescence d'ovocytes exprimant diverses constructions. L'anticorps anti-HA (rouge) est dirigé contre un tag situé en C-ter de la séquence de GLIC. La GFP est co-injectée avec les mutants comme contrôle d'injection. La barre d'échelle représente 50µM.

Des tests d'immuno-marquages réalisés sur des ovocytes exprimant le mutant montrent une expression robuste des récepteurs à la membrane,

suggérant que la faiblesse (ou l'absence) des courants est due à une faible probabilité d'ouverture (Figure 2).

Mutant	pH ₅₀	nH	I _{max} (μA)	n
GLIC sauvage	5,3±0,2	1,29±0,06	6±1	4
F195A	ND	ND	<1	3
Q193C	5,0±0,1	1,6±0,4	5±1	3
Q193M	4,53±0,02	2,39±0,09	0,7±0,1	3
Q193L	4,48±0,05	2,8±0,5	1,2±0,3	3

Table 1 : Caractéristiques fonctionnelles des mutants du pré-M1. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. ND : non déterminable.

Les mesures électrophysiologiques réalisées dans le cadre de l'étude de GLIC par fluorescence ont montré que la position Q193C (pré-M1) (Figure 1) n'était plus, ou faiblement, activable suite à la liaison avec le méthylmethanethiosulfonate (MMTS). Ce phénotype a été exploité pour les études de marquage au bimane, mais j'ai également cherché à mimer la fixation du MMTS par une mutation en méthionine. Comme attendu, la mutation Q193M provoque une forte perte de fonction des récepteurs avec un pH₅₀=4,5 et des courants de très faible amplitude (I_{max}=0,7±0,1) (Table 1). De même, la mutation Q193L est caractérisée par un pH₅₀=4,5 avec, toutefois, des courants légèrement plus grands (I_{max}=1,2±0,3) (Table 1). Ces données montrent qu'un résidu hydrophobe à la position 193 provoque un fort phénotype perte de fonction.

La glutamine 193 étant proche de la boucle M2-M3, j'ai également testé le double mutant P250C-Q193C dans le but de lier de façon covalente, par un pont disulfure, le pré-M1 à la boucle M2-M3 de la sous-unité adjacente. Ce mutant est constitutivement ouvert, avec des courants de fuite allant jusqu'à 1μA (Figure 3). Ces courants sont bloqués par le bloquant du canal picrotoxine, suggérant qu'ils sont dus à l'ouverture des canaux de GLIC, mais le traitement par le DTT des ovocytes ne permet pas de refermer les canaux. De plus, les courants enregistrés suite à des

applications d'agoniste sont presque toujours inférieurs à $1\mu\text{A}$ rendant toute analyse difficile.

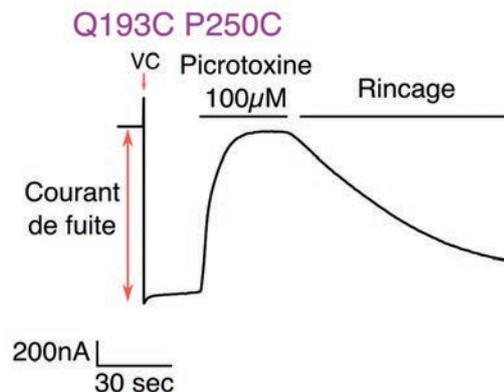


Figure 3 : Ouverture spontanée du mutant Q193C-P250C. Le tracé électrophysiologique montre le courant de fuite enregistré en absence d'agoniste. La flèche VC indique le point d'imposition d'un voltage membranaire (-40mV) permettant de visualiser les courants à la membrane. Dans cet enregistrement la picrotoxine est appliquée en tant que bloqueur du canal pour attester que les courants enregistrés sont portés par GLIC, les courants endogènes à l'ovocyte n'étant pas sensibles à ce bloquant.

3.3.2 Structures des mutants du pré-M1

Les mutants générés à la position Q193 montrant des phénotypes intéressants, ils ont été cristallisés (Haidai Hu et Marc Delarue).

De façon intéressante, l'inspection de la région du pré-M1 dans la structure GLIC_{pH4} sauvage montre un réseau d'interactions où la chaîne latérale du Q193 contacte deux molécules d'eau structurées, qui à leur tour contactent soit la boucle M2-M3, soit la boucle F (Figure 4A).

La résolution de la structure du mutant Q193C, dont la fonction est identique au récepteur sauvage, montre un réseau d'interaction similaire. Cependant, la chaîne latérale du Q193C apparaît déplacée vers le bas, s'éloignant de la molécule d'eau supérieure et se rapprochant de la proline 250, suggérant une interaction directe des deux positions (Figure 4A).

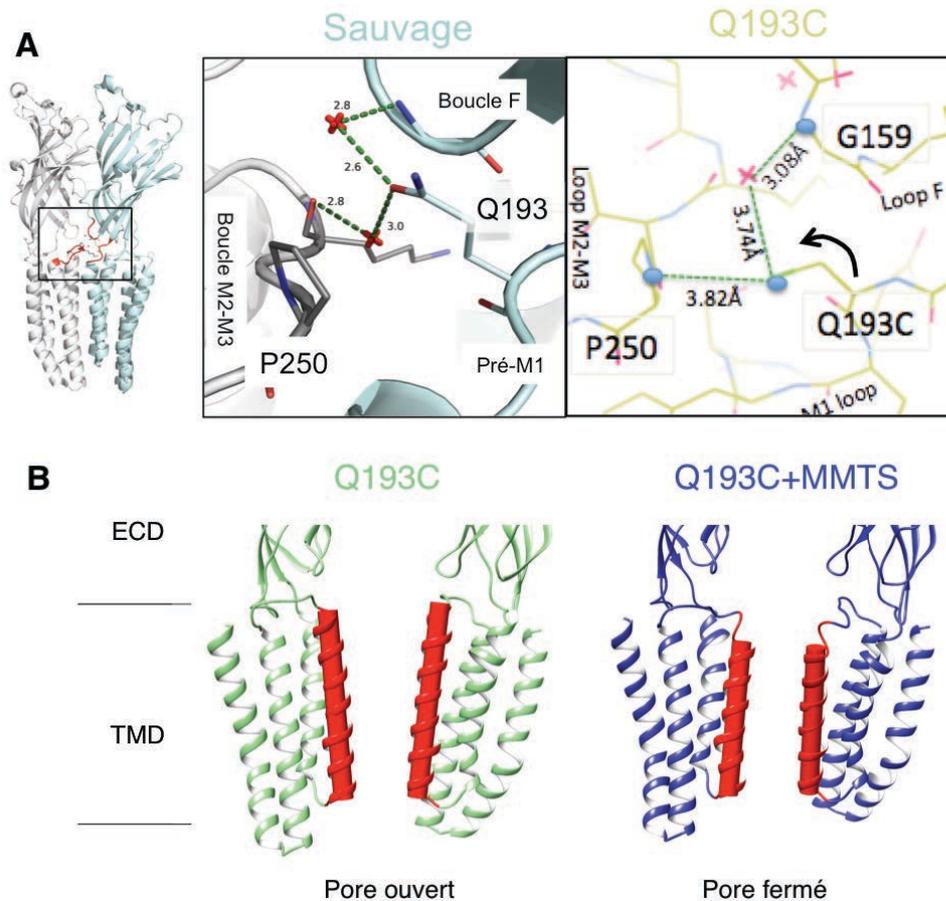


Figure 4 : Structures de GLIC Q193C. A : Zoom sur l'interface ECD/TMD. Gauche : structure de GLIC_{pH4} sauvage. Droite : structure de GLIC Q193C. Les traits pointillés indiquent les interactions potentielles entre résidus et molécules d'eau (croix rouges). B : vue de deux sous-unités de GLIC au niveau du pore pour le mutant Q193C (vert) et Q193C-MMTS (bleu). Les hélices M2 formant le pore, dans des conformations différentes entre les deux structures, sont colorées en rouge. Cette figure m'a été fournie par Haidai Hu.

En revanche, la structure du Q193C lié au MMTS et les structures des mutants Q193L et Q193M montrent toutes une conformation de type LC1 présentant un ECD dans une conformation active, et un TMD dans une conformation de repos (Figure 4B et Table 2).

L'examen de la région du pré-M1 de ces mutants montre que la chaîne latérale en position 193 est déplacée vers l'extérieur de la protéine (Figure 5), perturbant le réseau d'interaction avec la boucle M2-M3. .

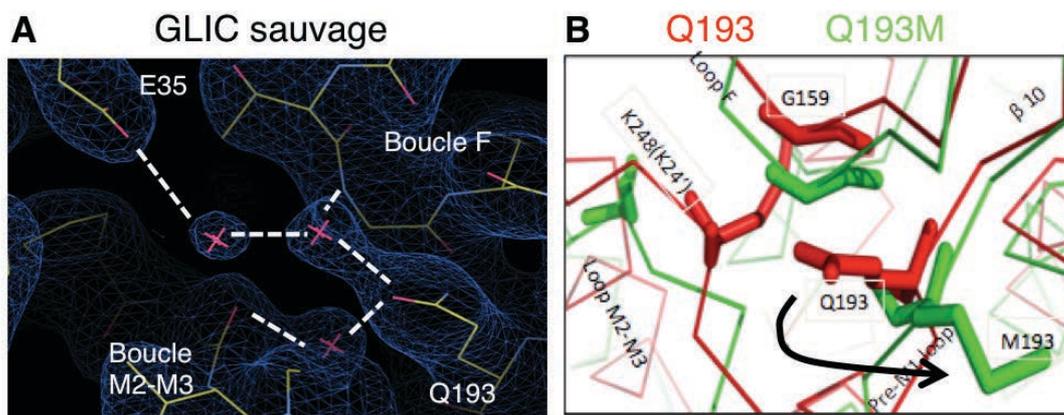


Figure 5 : Structure de GLIC Q193M. A : Zoom sur le pré-M1 de GLIC sauvage pour rappel des interactions effectuées par le réseau de molécules d'eau. B : Zoom sur le pré-M1 de GLIC Q193M (vert) superposé à la structure de GLIC sauvage (rouge). La flèche indique le mouvement effectué par la chaîne latérale de la position 193.

Ces données suggèrent donc un rôle critique de l'interaction pré-M1/boucle M2-M3 dans la stabilisation de l'état ouvert. Cette idée est par ailleurs renforcée par le phénotype du double mutant P250C-Q193C qui est constitutivement actif (Figure 12).

Mutant	Conditions de cristallisation et conformation
Q193C	pH4 – active
Q193C-MMTS	pH4 – LC1
Q193M	pH4 – LC1
Q193L	pH4 – LC1
P250C-Y197F	pH4 – LC1

Table 2 : Structures des mutants de GLIC.

Certains des mutants de M1 montrent également des phénotypes intéressants pour la désensibilisation de GLIC ; ces données sont présentées dans les parties suivantes. Le pré-M1/M1 ayant ainsi un rôle dans l'activation et la désensibilisation, les données des deux parties seront discutées ensemble à la fin de ce chapitre.

3.4 Etat des lieux des connaissances sur la désensibilisation de GLIC

GLIC étant un récepteur modèle largement utilisé pour l'étude des RCPs, différentes études se sont penchées sur la caractérisation de sa désensibilisation par électrophysiologie (Figure 6).

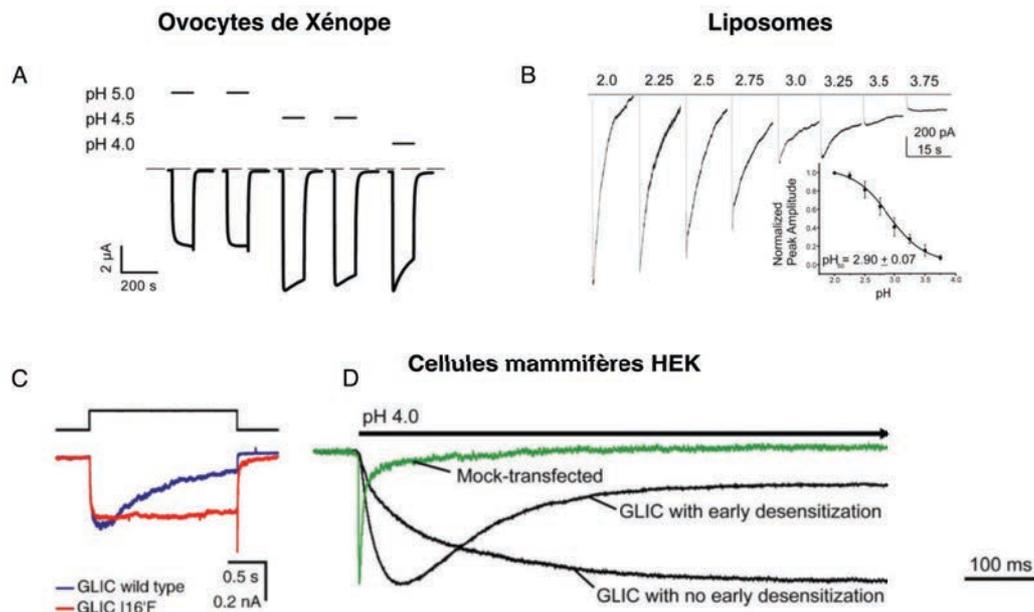


Figure 6: Divergence des données publiées sur la désensibilisation de GLIC. Toutes les traces présentent des courants enregistrés suite à l'application d'agoniste (le proton) sur le récepteur GLIC. A : Enregistrements en ovocytes de Xénope publiés par Parikh *et al.* 2011. B : Enregistrements en inside-out de GLIC reconstitué en liposomes d'asolectine, publiés par Velisetty et Chakrapani, 2012. C : Enregistrements en patch-clamp issus de cellules HEK en conformation outside-out publiés par Gonzalez-Gutierrez et Grosman, 2012. La trace bleue a été enregistrée pour GLIC sauvage, et la trace rouge a été enregistrée pour un mutant du pore ne montrant pas de désensibilisation (activation à pH4). D : Enregistrements en cellules HEK en conformation outside-out montrant la variabilité des mesures de désensibilisation, publiés par Laha *et al.* 2013.

Une étude réalisée en ovocyte de Xénope a initialement montré que GLIC désensibilise partiellement à haute concentration d'agoniste (à pH4, 20% de désensibilisation après 3 min d'application) (Figure 6A) (Parikh *et al.*, 2011). Une seconde étude réalisée sur cellules HEK293 en patch-clamp (configuration outside-out) montre une désensibilisation complète après

une application de proton à pH4,5 de 10 secondes, avec toutefois une grande disparité d'un patch à l'autre, et des constantes de temps variant de 75 ms à 10 s (Figure 6C) (Gonzalez-Gutierrez and Grosman, 2010). Une autre étude réalisée sur des cellules HEK observe également une grande variabilité dans la désensibilisation de GLIC, celle-ci comportant une composante rapide pour seulement la moitié des patchs enregistrés. Cette étude montre une désensibilisation partielle de GLIC après 10 s d'application de solution à pH4 (Figure 6D) (Laha et al., 2013). Enfin, une étude plus récente effectuée sur GLIC reconstitué en liposomes conclut sur des caractéristiques inhabituelles du récepteur canal pour lequel l' EC_{50} ne se situe plus à pH5,3 mais à pH2,9, et montre une désensibilisation totale du récepteur à pH2 (Figure 6B) (Velisetty and Chakrapani, 2012a). Il reste donc à ce jour une grande divergence des données publiées concernant la désensibilisation de GLIC.

3.5 Caractérisation électrophysiologique de la désensibilisation de GLIC

3.5.1 Etude du récepteur sauvage

Pour tous les résultats présentés dans cette partie, les enregistrements électrophysiologiques ont été réalisés en ovocytes de *Xénope*.

Pour une première caractérisation, j'ai enregistré les courants de GLIC sous une perfusion à pH5, pH4,5 et pH4, pendant quelques minutes (de 2 à 5 minutes). La figure 7 montre une augmentation du courant, sur une durée allant de 30 secondes à 1 minute après le début d'application d'agoniste, jusqu'au pic d'activation maximal. Celui-ci est suivi par une diminution, sous application prolongée d'agoniste, pouvant correspondre à la désensibilisation.

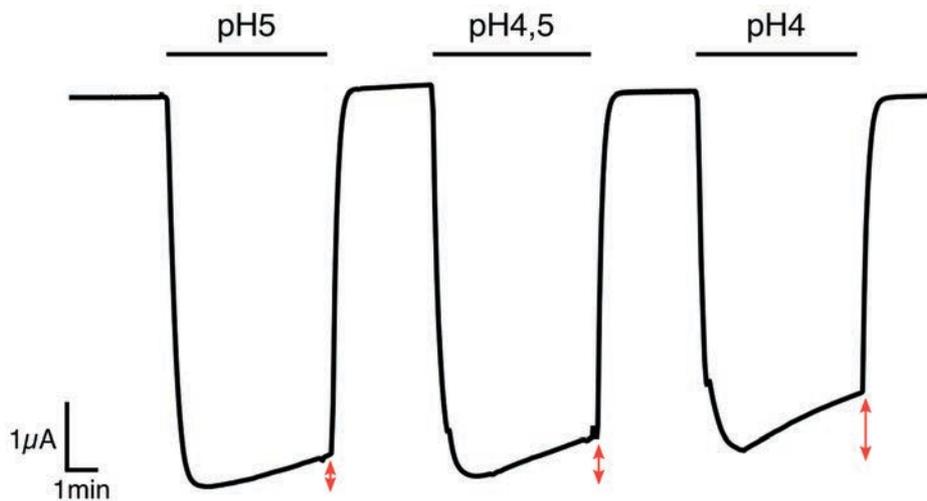


Figure 7 : Désensibilisation apparente de GLIC suite à des applications courtes d'agoniste. Entre chaque application de pH les cellules sont rincées avec une solution à pH7,3. Les flèches rouges indiquent l'amplitude de la désensibilisation apparente des récepteurs.

Cependant, on observe que le courant maximal diminue à chaque application, alors même que la concentration d'agoniste augmente, suggérant un phénomène de « run-down » des récepteurs. Le « run-down » est un terme général utilisé pour décrire toutes causes entraînant une diminution de courant, autres que la désensibilisation. Celles-ci incluent l'inactivation irréversible des récepteurs, leur endocytose-exocytose et des changements métaboliques au sein des cellules en réponse aux flux entrants d'ions et de protons ; ces derniers pouvant également modifier les équilibres allostériques de GLIC, par notamment la protonation de résidus du domaine intracellulaire, connus pour inhiber le récepteur (Hilf and Dutzler, 2009). Il est également possible que le temps de rinçage de la cellule, ici de 3 minutes, ne soit pas suffisant pour resensibiliser les récepteurs entrés dans l'état D. Notons toutefois que ce phénomène de diminution du courant maximal à hauts pHs est également observé avec des temps de rinçage plus longs.

En conclusion, la forme des traces de courant ne permet pas de mesurer la désensibilisation de GLIC, mais seulement une désensibilisation apparente, mesurée à 11% après 2 min avec une constante de temps de 14 min (Tableau 3).

Mutant	pH ₅₀	nH	I _{max} (μA)	τ désensibilisation apparente (min)	Désensibilisation apparente 2 min, pH4 (%)	Désensibilisation théorique (%) pH4	n
GLIC sauvage	5,3±0,2	1,29±0,06	6±1	14±4	11±1	25	4
Q193C	5,0±0,1	1,6±0,4	5±1	6,5	13	NM	1
P250C Y194F	5,1±0,2	1,7±0,4	6,4±0,8	1,4±0,3	21±4	64	3
P250C Y197F	5,2±0,1	1,3±0,3	8±1	τ rapide : 23±16 sec τ lent : 2±2 min	41±2	39±6	4

Table 3 : Caractéristiques électrophysiologiques des mutants du pré-M1 désensibilisant. La colonne n indique le nombre de cellules enregistrées pour le calcul du τ et du % de désensibilisation. Les valeurs de pH₅₀, nH (nombre de Hill) et I_{max} ont été calculées sur au moins 3 cellules différentes. NM est indiqué pour les points non mesurés. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type.

Afin de pouvoir différencier désensibilisation et run-down, j'ai utilisé les propriétés du bloquant de canal picrotoxine (PTX) décrites pour le récepteur GABA_A et Glycine (Gielen et al., 2015). Ces études ont montré que ce bloquant a une meilleure affinité pour l'état A que pour l'état D, déplaçant ainsi l'équilibre A-D vers l'état A. Ainsi, à concentration saturante d'agoniste (pH4), une augmentation des courants consécutive à la co-application de picrotoxine sera indicative du fait qu'une fraction des récepteurs était désensibilisée et a été recrutée vers l'état actif. Ce phénomène a été initialement décrit sur le récepteur GABA_A, où le rinçage de la picrotoxine produit un courant de rebond (Figure 8).

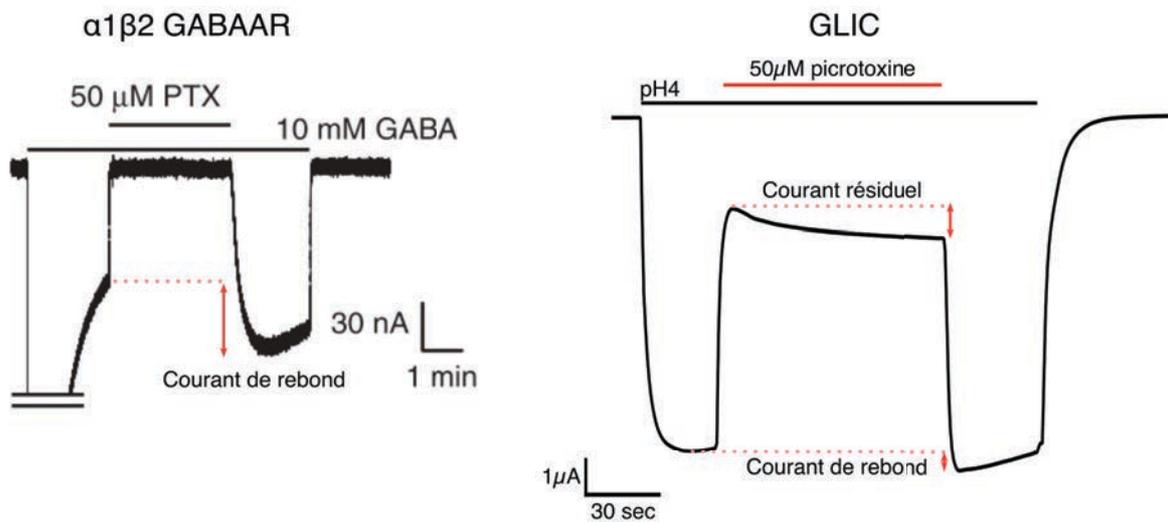


Figure 8 : Effet de la picrotoxine sur les courants de GLIC. Tracés électrophysiologiques du récepteur GABA_A (gauche) et de GLIC (droite) suite à une application d'agoniste et une co-application de picrotoxine. Le tracé de gauche est extrait de Gielen *et al.* 2015.

Sur GLIC, l'application de picrotoxine entraîne également un courant de rebond, de faible amplitude (6%), révélant l'existence de récepteurs désensibilisés à la membrane (Figure 8), alors même que la trace d'activation ne montre pas de désensibilisation apparente.

On observe également que la concentration de picrotoxine utilisée ici (50 μM) ne bloque que 70% des récepteurs actifs et que le courant résiduel mesuré augmente de 30% pendant la perfusion de PTX, laissant supposer que la désensibilisation peut être plus importante que celle mesurée à travers le courant de rebond (Figure 8). En admettant que ce rapport 30/70 est constant lors de la perfusion de PTX, alors l'augmentation de 30% du courant résiduel rend compte d'une augmentation de 30% de la population totale des récepteurs actifs (Figure 9). Ainsi, on peut conclure qu'avant perfusion de picrotoxine, au moins 25% des récepteurs étaient désensibilisés. Toutefois, il est possible que la picrotoxine ne déplace pas complètement l'équilibre A-D, et que le courant résiduel de départ soit significativement surestimé à cause de courants endogènes des ovocytes activés par les protons. Notons que ces courants endogènes ne sont pas sensibles à la picrotoxine, l'augmentation du

courant résiduel ne peut donc leur être attribué. Ainsi, la valeur de 25% est une valeur minimale de désensibilisation.

En conclusion, cette expérience permet de conclure sans ambiguïté sur l'existence d'une fraction de récepteurs désensibilisés indépendamment de tout run-down (Figure 9).

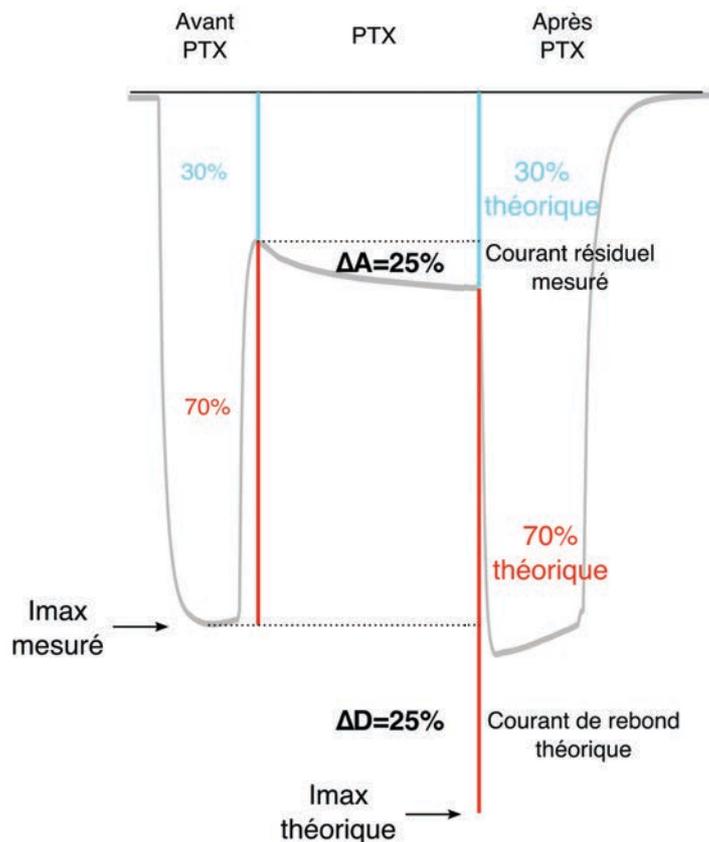


Figure 9 : Calcul de la désensibilisation de GLIC suite à l'application de PTX. Les intensités de courants théoriques sont superposées à la trace mesurée sur un ovocyte exprimant GLIC et perfusé par une solution de pH4 en présence ou non de 50 μ M de picrotoxine.

On observe également figure 9 que le courant de rebond évalué à partir des courants résiduels est plus grand que le courant de rebond mesuré. Cela peut être expliqué par une cinétique de rinçage de la PTX plus lente que celle de la désensibilisation. Notons d'ailleurs qu'un faible courant de rebond est également observé pour la même expérience réalisée sur le récepteur GABA_A (Figure 8).

3.5.2 Mutations dans la région du pré-M1 et de l'hélice M1

Au sein du projet d'étude par fluorescence de GLIC, la caractérisation électrophysiologique des mutants a révélé certains phénotypes désensibilisants, particulièrement lors de mutations dans le pré-M1 et l'hélice M1, avec les mutants Q193C, P250C-Y194F et P250C-Y197F (Figure 10).

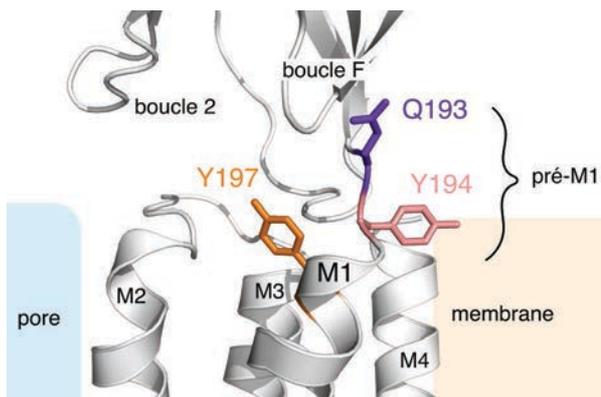


Figure 10 : Structure du pré-M1/M1. La figure présente un zoom de la structure GLICpH7 sur l'interface entre ECD et TMD. Le pré-M1 représente la région entre l'ECD et l'hélice M1.

Le mutant Q193C (non marqué par le bimane) montre une désensibilisation apparente plus rapide et plus importante que GLIC sauvage. En effet, la décroissance du courant atteint 40% après 10 min contre 27% pour GLIC sauvage, avec un $\tau=6,5$ min contre 14 min pour le récepteur sauvage. (Table 3 et Figure 11).

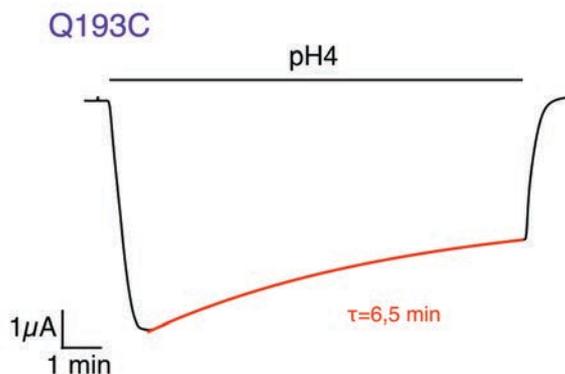


Figure 11 : Tracé électrophysiologique typique du mutant Q193C. La mesure de courant est faite sous une perfusion prolongée à pH4. La trace rouge représente le meilleur ajustement de la désensibilisation apparente à une équation mono-exponentielle.

Les doubles mutants P250C-Y194F et P250C-Y197F (Figure 10) montrent également une désensibilisation apparente plus importante que celle du récepteur sauvage (Figures 12 et 13), avec toutefois une importante variabilité, deux profils étant observés suivant l'ovocyte testé :

1) Cinétiques d'activation lentes et variables (du même ordre de grandeur que ceux de GLIC), suivis par un plateau sans décroissance des courants (Figure 13).

2) Cinétiques d'activation rapides suivies par une décroissance du courant (Figure 12). Cette décroissance atteint 20% (P250C-Y194F) et 40% (P250C-Y197F) après 2 minutes de perfusion à pH4, contre 10% pour GLIC sauvage (Table 3 et Figure 12).

L'analyse des cinétiques de la décroissance des courants de P250C-Y197F révèle deux phases avec $\tau_{rapide}=23\pm 16$ sec et $\tau_{lent}=2\pm 2$ min (Table 3). La décroissance du courant du mutant P250C-Y194F est quant à elle mieux ajustée par une seule exponentielle donnant un $\tau=1,4\pm 0,3$ min (Table 3).

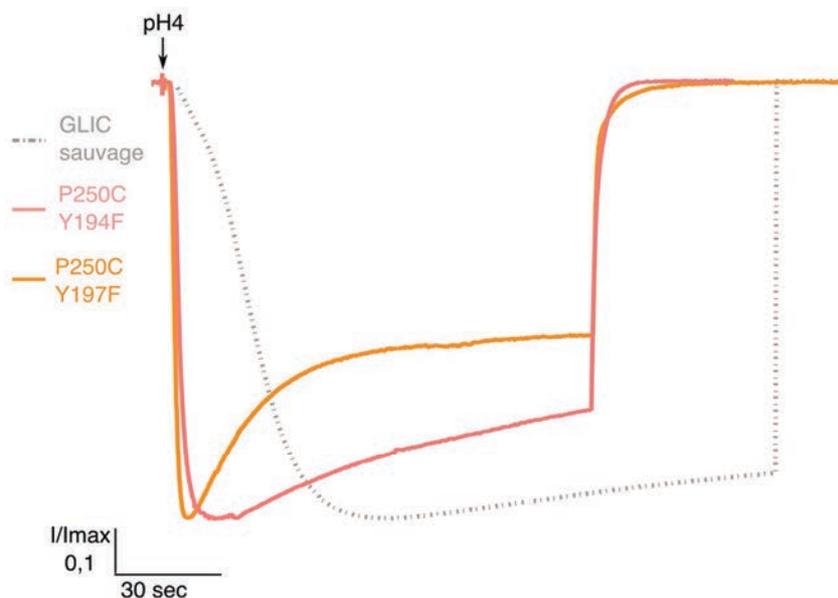


Figure 12 : Impact des tyrosines de M1 sur la désensibilisation apparente de GLIC. Les trois tracés électrophysiologiques représentés ont été normalisés sur leur intensité de courant maximale pour pouvoir être comparés, et ont été superposés au point d'application de l'agoniste (pH4).

Ces deux mutants ont également été soumis à des applications de picrotoxine qui permettent de mesurer un courant de rebond de $39\pm 26\%$ pour P250C-Y197F et de 37% pour P250C-Y194F (Figure 13). En parallèle, et comme calculé pour GLIC sauvage, l'augmentation du courant résiduel permet de dire que 39 ± 6 (Y197F) et 64% (Y194F) des récepteurs ont désensibilisé. De façon intéressante, dans le cas du mutant P250C-Y197F, les trois mesures de désensibilisation utilisées : décroissance du courant (quand elle peut être mesurée), courant de rebond et courant résiduel, donnent le même pourcentage de désensibilisation.

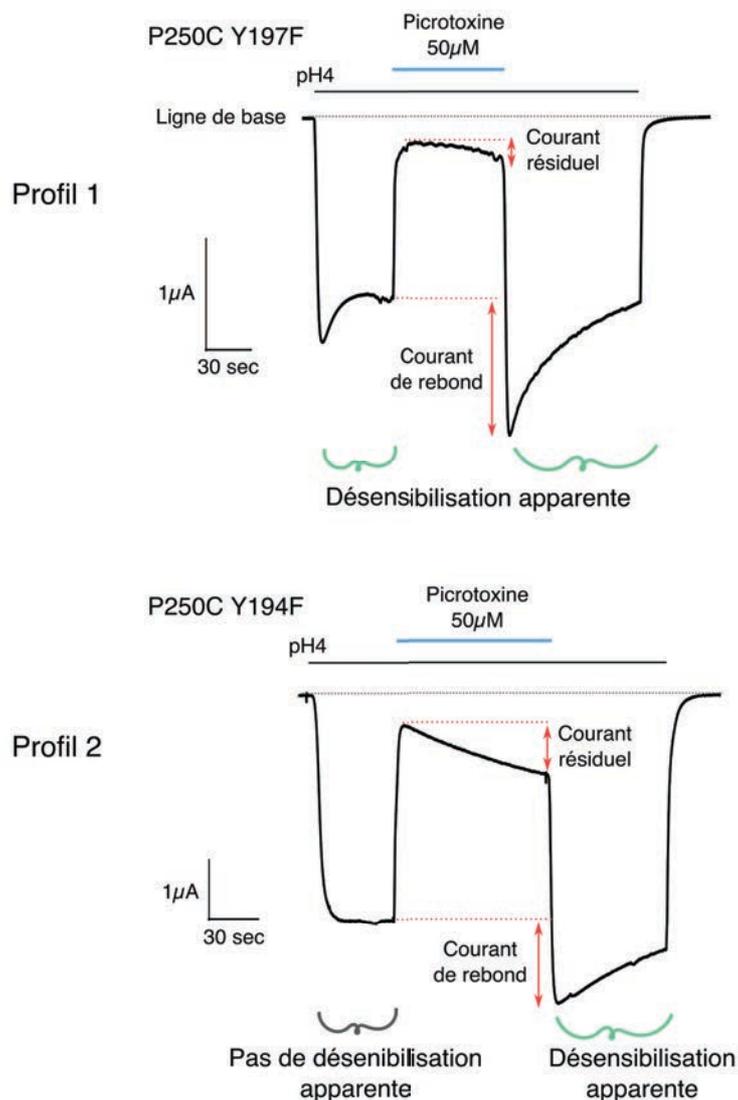


Figure 13 : Effet d'une application de picrotoxine sur les mutants du pré-M1. Pour les deux traces, toutes les annotations sont identiques.

En conclusion, malgré la variabilité des cinétiques enregistrées, ces données montrent que les deux mutants causent une stabilisation importante de l'état désensibilisé.

3.5.3 Variabilité de la désensibilisation apparente de GLIC et de ses mutants

Les enregistrements effectués en présence de picrotoxine permettent une évaluation reproductible de la désensibilisation, alors même que les cinétiques de désensibilisation apparentes montrent une grande variabilité suivant l'ovocyte testé. En particulier, dans certains ovocytes, l'augmentation du courant résiduel est observée même lorsqu'il n'y a pas de désensibilisation apparente préalable (Figure 13). Cela suggère que, lors de la phase initiale d'apparition du courant, le processus de désensibilisation est déjà à l'œuvre, et donc que les cinétiques d'activation et de désensibilisation sont dans la même gamme temporelle.

En effet, des traces électrophysiologiques théoriques (Figure 14) montrent un pic de courant (activation) suivi d'une décroissance (désensibilisation) uniquement lorsque la cinétique d'activation est plus grande que celle de désensibilisation (tracés de droite, $k_{on1}/k_{on2}=7000$). Dans ce cadre, une augmentation de la désensibilisation (mimée par les variations du rapport k_{on2}/k_{off2}) est visualisée par une augmentation de l'amplitude de décroissance et de sa cinétique. A l'inverse, lorsque les cinétiques d'activation et désensibilisation sont similaires (tracés de gauche, $k_{on1}/k_{on2}=1$) les traces montrent une augmentation suivie d'un plateau. Dans ce cadre, une augmentation de la désensibilisation résulte en un courant maximal plus faible. Bien qu'encore incomplètes, les données électrophysiologiques révèlent que les mutants augmentent systématiquement, et de façon reproductible, la désensibilisation de GLIC. Ainsi, la variabilité des courants enregistrés peut en fait être attribuée à une variabilité des cinétiques d'activation.

A ce stade des expériences, la cause de cette variabilité n'est pas connue. Mais, étant enregistrée pour un même mutant, on peut considérer qu'elle n'est pas causée directement par la mutation mais qu'elle est dépendante

de l'état des cellules. On peut spéculer que certains lipides (lipides anioniques ou cholestérol), neurostéroïdes, ou autre métabolite, pourraient varier d'une cellule à l'autre, mais plus encore d'un animal à un autre, influençant par là-même l'équilibre allostérique des récepteurs. Pour étudier cet aspect, il serait intéressant de réaliser des mesures électrophysiologiques dans des environnements lipidiques contrôlés tels que les liposomes artificiels.

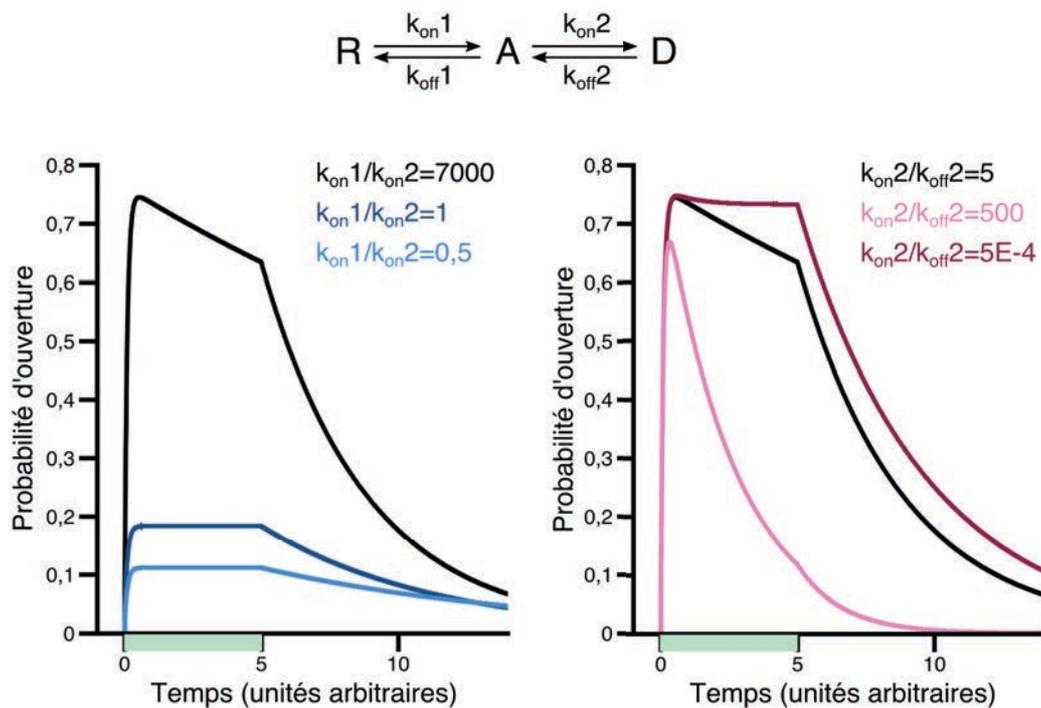


Figure 14 : Tracés théoriques de courants selon différents paramètres. Les traces présentées ont été obtenues avec le logiciel Channelab et présentent les courants théoriques obtenus selon un modèle minimal à trois états : repos (R), actif (A) et désensibilisé (D). Pour chacune des traces seul le rapport indiqué dans le graphique a été modifié, avec comme paramètres par défaut : $k_{on1}/k_{on2}=7000$, $k_{on2}/k_{off2}=5$ et $k_{on1}/k_{off1}=3,5$. La bande de couleur verte représente le temps d'application d'agoniste, qui dans tous les cas a été fixé à $10^{-4}M$ (pH4).

Il serait également particulièrement intéressant de réaliser des enregistrements en patch-clamp permettant d'utiliser des systèmes de perfusion plus rapides qu'en ovocyte. Ces enregistrements pourraient permettre de différencier les cinétiques d'activation et de désensibilisation et ainsi mieux caractériser le récepteur sauvage et les mutants.

3.6 Etude structurale du mutant P250C-Y197F

Dans le but de compléter l'étude du mutant P250C-Y197F, sa structure a été résolue par cristallographie (Reinis Reinholds Ruza, Marc Delarue).

Dans le processus de cristallogenèse utilisé, les récepteurs sont en contact pendant plusieurs jours avec la solution d'agoniste, le mutant P250C-Y197F désensibilisant plus que le récepteur sauvage, on espérait ainsi obtenir une conformation désensibilisée. Or la cristallisation de ce mutant à pH4 donne une structure de conformation LC1. La conformation LC1 présente un ECD de type actif et un TMD, ainsi que la boucle M2-M3, de type repos.

L'interprétation la plus simple serait que la conformation LC1 corresponde à l'état désensibilisé. Cependant, plusieurs arguments semblent invalider cette hypothèse :

- 1) Les études de fluorescence présentées dans cette thèse indiquent que la boucle M2-M3 effectue un mouvement vers l'arrière au cours de la désensibilisation, en contradiction avec la position de cette boucle dans la conformation LC1.
- 2) Le TMD d'un récepteur en conformation LC1 est quasiment identique à la conformation de repos obtenue à pH7 (Figure 15) (Prevost et al., 2012). Si LC1 était désensibilisé, le proton favoriserait une transition du TMD vers son état ouvert, suivi d'un retour vers l'état initial lors de la désensibilisation. Ce mécanisme de transition semble paradoxal énergétiquement.
- 3) La structure de récepteur GABA_A résolue par cristallographie et proposée comme représentant l'état désensibilisé est très différente de la conformation LC et montre un pore ouvert dans sa partie haute et fermé dans sa partie basse (Figure 15) (Miller and Aricescu, 2014). De plus, cette conformation du pore dans l'état désensibilisé a été proposée pour d'autres récepteurs, mais également pour GLIC, suite à des études de RPE sur les récepteurs en solution (Gielen et al., 2015; Kinde et al., 2015; Velisetty et al., 2012b).

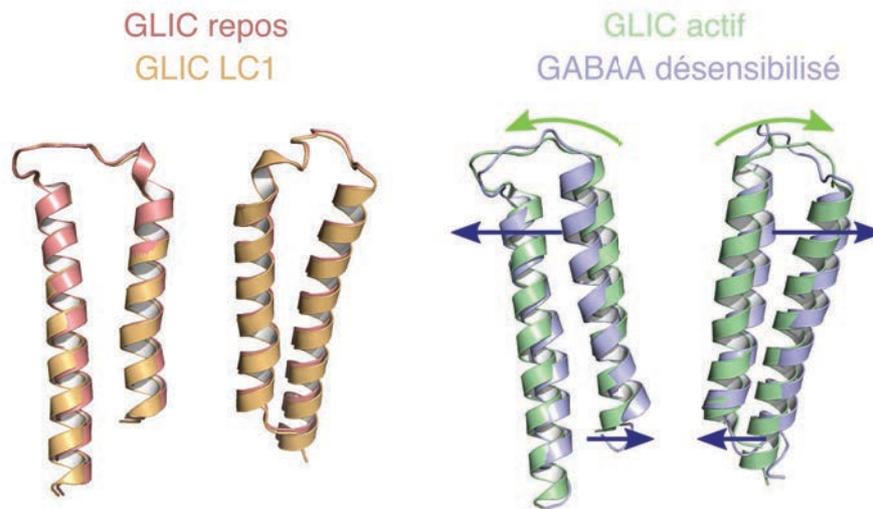


Figure 15 : Structure du pore dans les différentes conformations cristallisées. Les flèches indiquent les mouvements principaux proposés à partir des structures pour l'activation (vert) et la désensibilisation (violet).

Ce résultat est donc particulièrement surprenant mais peut être expliqué de deux façons. Premièrement, la région du pré-M1 a été identifiée comme critique pour la stabilisation de l'état actif, ainsi on peut proposer que la mutation P250C-Y197F défavorise l'activation. Cette hypothèse est toutefois peu probable étant donné que les récepteurs enregistrés fonctionnellement montrent une activation avec des courants robustes, et pas de perte d'affinité apparente pour l'agoniste. De plus, la conformation LC1 n'a été observée que sur des récepteurs portant des mutations et étant non-fonctionnels, à l'exception d'un récepteur sauvage (Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2012). Cependant, ce récepteur sauvage porte un tag histidine après son hélice M4 le rendant non-fonctionnel en ovocytes et cellules HEK, mais fonctionnel en cellules d'insectes, indiquant ici également une perturbation profonde de l'équilibre allostérique du récepteur (Sauguet et al., 2014). On pourrait donc proposer que la conformation LC1 soit une conformation « non-naturelle » stabilisée lorsque le fonctionnement ou la structure des récepteurs sont perturbés par une mutation.

La deuxième hypothèse serait que les conditions de cristallisation utilisées, qui sont toujours identiques pour toutes les constructions de GLIC, favorisent la conformation active ou LC du récepteur. En effet, en diverses occasions, il a été observé que le processus de cristallisation

semblait favoriser une conformation indépendamment des ligands présents avec les récepteurs (Gonzalez-Gutierrez et al., 2012; Nury et al., 2011). A ce stade, il semble nécessaire de réaliser des essais de cristallogenèse dans d'autres conditions afin de stabiliser, dans le cristal, des conformations différentes de GLIC.

3.7 Discussion générale et modèle structural

Les résultats présentés dans cette partie montrent que les régions du haut de M1 et du pré-M1 jouent un rôle critique dans les propriétés fonctionnelles de GLIC.

Les mutants F195A et Q193L/M sont quasiment non-fonctionnels. Q193C voit une cinétique de désensibilisation apparente accélérée, alors que Q193C-P250C est constitutivement activé.

Les doubles mutants P250C-Y194F ou -Y197F provoquent une stabilisation de l'état D, et possiblement une accélération de l'activation. Le simple mutant P250C montrant un profil fonctionnel proche du récepteur sauvage, ces phénotypes sont majoritairement dus aux mutations des deux tyrosines.

La résolution des structures des mutants Q193L/M et Y197F montrent un TMD de type repos et une boucle M2-M3 vers le pore. Or, les structures de GLIC_{pH4} montrent que, dans la conformation active, la boucle M2-M3 est située vers l'arrière et les trois résidus Q193, F195 et Y197 peuvent effectuer trois interactions distinctes avec cette boucle (Figure 16). Notamment pour les couples F195-M252 et Y197-K248, la position des chaînes latérales de M252 et K248 indiquent que ces interactions ne sont possibles que lorsque la boucle M2-M3 est vers l'arrière (Figure 16). Dans le cas particulier du couple Q193-P250, l'interaction peut ne pas être directe mais s'effectuer à travers un réseau de molécules d'eau. En effet, la mutation en alanine de la proline 250 a été rapportée comme ayant un phénotype sauvage (Rienzo et al., 2016), comme cela est également montré par la mutation P250C. Toutefois, que cette interaction soit directe ou non, le phénotype des mutants Q193M/L suggère qu'un acide aminé à

cette position pouvant effectuer des liaisons hydrogènes est nécessaire à l'activation.

Ainsi, l'analyse combinée par électrophysiologie et cristallographie révèle un rôle fort du M1/pré-M1 dans la stabilisation de la boucle M2-M3 vers l'arrière et ainsi la stabilisation de l'état pré-actif et/ou actif (Figure 16).

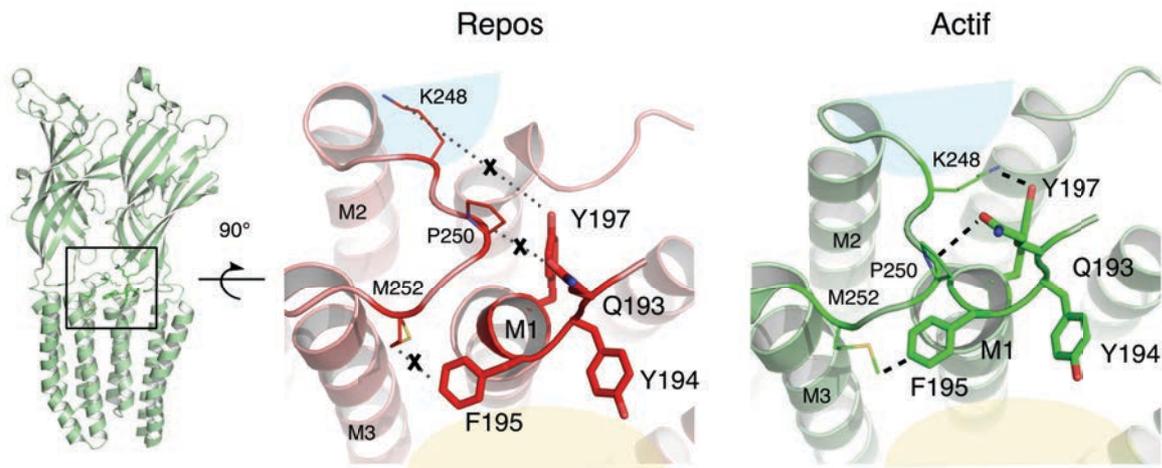


Figure 16 : Vue structurale des interactions entre le préM1/M1 et la boucle M2-M3. Le zoom de gauche (rouge) a été réalisé à partir de la structure GLICpH7, donc supposée dans l'état de repos. Le zoom de droite (vert) a été réalisé à partir de la structure GLICpH4 supposée de l'état actif. Les deux zooms ont exactement la même orientation et ont été effectués sur les deux structures alignées ; les positions relatives de chaque acide aminé peuvent donc être comparées.

De façon intéressante, une étude de REFER de la position équivalente à Q193 chez le récepteur nicotinique montre que cette position bouge « tard » dans la transition d'activation, approximativement en même temps que les « portes » d'activation du pore (Purohit and Auerbach, 2007). Cette étude renforce l'idée que les interactions identifiées ici ne sont pas nécessaires à la transition vers l'état actif, mais à sa stabilisation.

Notons également que l'interaction Y197-K248 n'est pas non plus nécessaire à l'activation, la mutation K248C présentant un phénotype gain de fonction important ($pH_{50}=6,3$) et le mutant (P250C)Y197F étant fonctionnel (Prevost et al., 2012). Ainsi, on peut aller plus loin dans les conclusions et suggérer que ces interactions jouent sur l'équilibre A-D en stabilisant l'état A devant l'état D.

Ainsi, la rupture de ces interactions, notamment par la mutation Y197F explique le phénotype désensibilisant du mutant.

Cette idée est d'ailleurs soutenue par la structure résolue du récepteur GABA_A, supposé dans l'état désensibilisé, où l'on peut voir que les deux résidus équivalents n'interagissent pas entre eux, à l'inverse, la tyrosine se trouve sous la boucle M2-M3 (Figure 17). De plus, les variations de fluorescence enregistrées à la position mBBR250, deux résidus après la lysine 243 (Figure 16 et Figure 9 Chap.2 Résultats), montrent que les deux résidus mBBR250 et de Y197 s'éloignent dans des gammes de temps compatibles avec la désensibilisation de GLIC. Ainsi on peut spéculer que dans la conformation désensibilisée, la boucle M2-M3 adopte une position encore plus extérieure qu'à l'état actif.

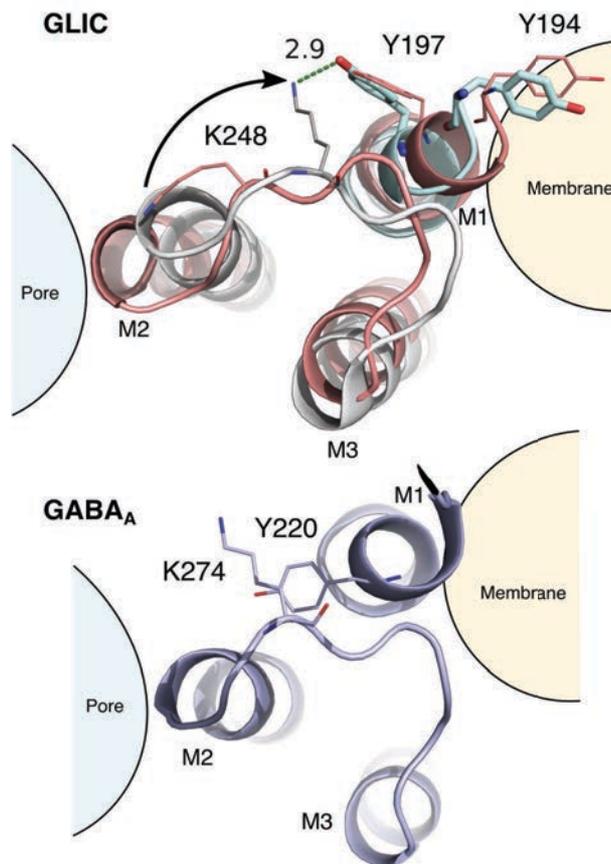


Figure 17 : Interactions entre l'hélice M1 et la boucle M2-M3. Pour les deux structures seules les hélices M2 et M3 d'une sous-unité, ainsi que l'hélice M1 de la sous-unité adjacente sont représentées. En haut, les structures de GLICpH7 (rouge) et GLICpH4 (bleu) sont superposées. En bas, la structure du β 3-GABA_A supposée dans l'état désensibilisé est représentée avec la même orientation que GLIC.

De façon remarquable, différentes mutations de la lysine 248 à la position équivalente chez le récepteur à la glycine entraînent la maladie hyperekplexia (Bode and Lynch, 2014; Poon et al., 2006). Le mécanisme par lequel ces mutations perturbent la fonction des récepteurs n'est pas encore établi mais souligne l'importance de cette région, et la probable conservation des interactions à travers les différents sous-types de RCPs.

Le cas de la mutation Y194F est plus difficile à interpréter, étant donné que sa chaîne latérale pointe vers les lipides. La structure GLIC_{pH4} permet d'observer un lipide co-purifié avec GLIC, assez proche du pré-M1 pour une interaction directe. Cependant, la mutation simple de cet acide aminé (Y194A) n'a pas révélé de phénotype particulier et il est probable que les effets décrits ici ne soient pas le résultat d'une interaction directe avec un résidu mais plutôt d'une réorganisation des interactions de cette région.

Il serait donc très intéressant de poursuivre les études des mutants F195A et Q193L/M par des applications de picrotoxine afin d'identifier si la rupture des interactions à ces positions facilite également la désensibilisation du récepteur.

On pourra alors confirmer l'hypothèse selon laquelle les interactions entre le préM1/M1 et la boucle M2-M3 stabilisent la conformation active, et par extension défavorisent toute autre conformation, telles que les états désensibilisés.

Ainsi, afin de caractériser plus profondément la participation à l'activation et à la désensibilisation de cette région du pré-M1, il serait intéressant d'utiliser les senseurs fluorescents développés dans la partie 1. En effet, la position mBBr250 se situant à proximité du pré-M1, elle est idéale pour étudier l'impact de cette région dans les réorganisations allostériques, et notamment l'impact de la glutamine 193. Cependant, l'étude de la position Y197 n'est pas possible directement, la présence d'une tyrosine à cette position étant nécessaire pour observer des changements de quenching de fluorescence du mBBr250. Néanmoins, une étude plus détaillée, par mutagenèse de cette région sera intéressante afin de mieux caractériser

les positions impliquées dans la stabilisation des états actif et désensibilisé de GLIC.

4. Projet 3 : Crible par électrophysiologie de composés ciblant la poche intra-sandwich de GLIC

4.1 Préface

Les travaux présentés dans cette partie ont été effectués au sein d'une collaboration entre les laboratoires de Marc Delarue, Arnaud Blondel et Pierre-Jean Corringer, à l'institut Pasteur.

Plus particulièrement, Nathan Desdouits, de l'équipe de A. Blondel, a généré les structures de GLIC permettant d'identifier les quatre cavités ciblées dans cette étude, et a réalisé les cribles virtuels.

Le crible électrophysiologique présenté ici a permis de révéler de nouveaux modulateurs de GLIC, et un second crible est en cours. Les conclusions de l'étude sont donc encore préliminaires.

4.2 Introduction

Les récepteurs-canaux participant à de nombreuses fonctions biologiques, ils sont au coeur d'une recherche active de nouveaux composés modulant leur fonction, notamment pour leurs intérêts thérapeutiques, comme cela peut être le cas avec les anesthésiques généraux ou les composés de sevrage à la nicotine.

La résolution de la structure de GLIC à pH7 a permis d'identifier une nouvelle cavité au sein de l'ECD (Sauguet et al., 2014). En effet, à pH7, les deux feuillets β formant l'ECD d'une sous-unité apparaissent « détachés » générant ainsi une cavité hydrophobe en leur sein. En comparant avec la structure à pH4, il apparaît que les deux feuillets sont plus proches dans la conformation active, et la taille de la cavité réduite. Ainsi, nous avons exploré la possibilité que cette cavité représente une nouvelle cible pharmacologique pour GLIC, et par extension pour les RCPs.

Cette cavité ne se superposant pas au site orthostérique, les molécules s'y liant et impactant la fonction du récepteur seront donc classifiées comme des modulateurs (Christopoulos et al., 2014). Notons toutefois que le récepteur GLIC n'est pas activé par un ligand traditionnel dont le site se trouve au sein de la poche orthostérique, et que le/les sites de liaison de l'agoniste (le proton) ne sont pas encore clairement identifiés (Duret et al., 2011; Rienzo et al., 2014; Wang et al., 2012). Néanmoins, la cavité ciblée étant très hydrophobe, il est peu probable qu'elle porte le/les sites de liaison des protons activant GLIC.

4.3 Réactifs ciblant les cystéines

L'unique cystéine endogène de GLIC se situe au fond de cette cavité intra-sandwich. Ainsi, notre première approche a été de tester des composés portant un groupement réagissant avec les cystéines (méthanethiosulfonate ou MTS) afin de les lier covalentement à l'intérieur de la cavité.

Pour cette approche, j'ai testé cinq composés de structure et taille différentes, par électrophysiologie sur le récepteur GLIC sauvage.

Pour chaque test, le composé est appliqué pendant au moins 2 min à pH7,3, cette durée étant suffisante pour la réaction de composés MTS sur le mutant de GLIC Q193C (voir méthodes). L'impact fonctionnel du composé est ensuite mesuré par une application d'agoniste. Si le composé entraîne un effet fonctionnel, l'ovocyte est ensuite rincé par une solution de DTT afin de réduire les ponts disulfures formés (Figure 1).

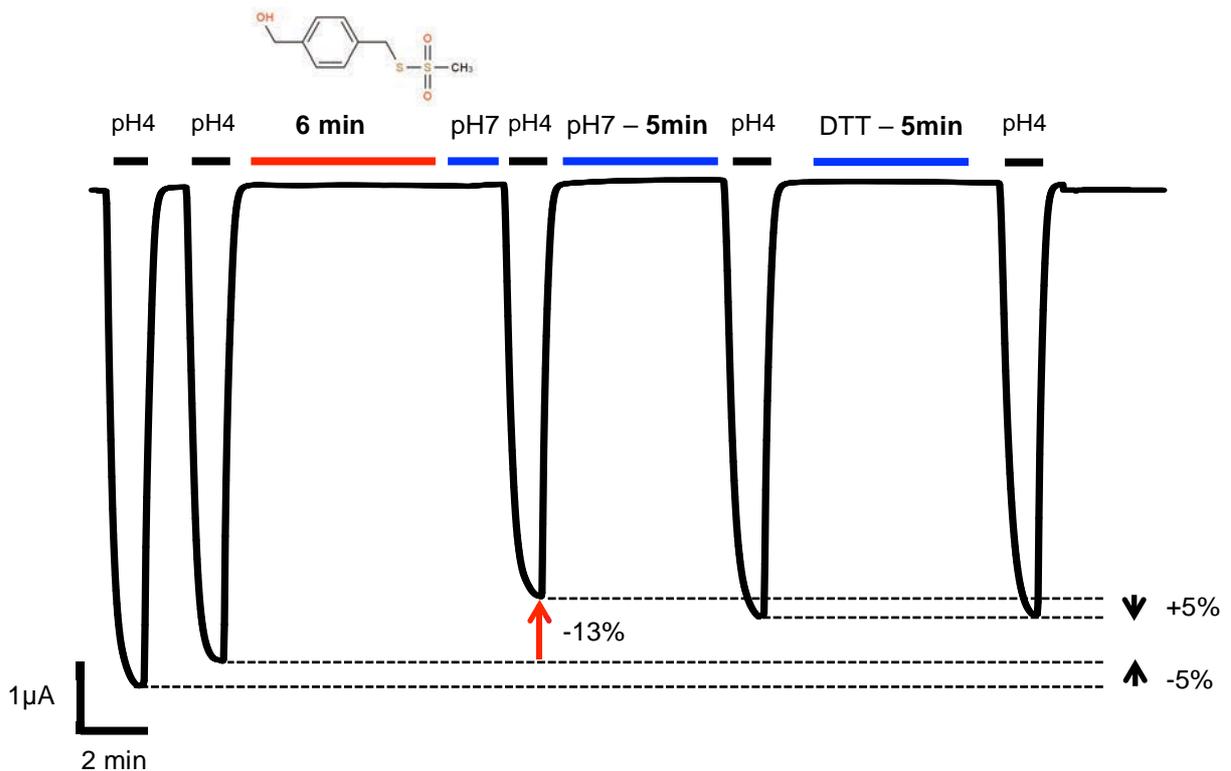
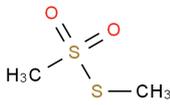


Figure 1 : Profil électrophysiologique typique pour le test fonctionnel d'un composé portant un groupement réactif des cystéines. L'exemple présenté ici est un des tests effectués pour le composé 4-(Hydroxy methyl)benzyl.

Lors de tout enregistrement électrophysiologique il peut y avoir des variations dans l'intensité des courants mesurés lors d'applications successives d'agoniste, en excluant la désensibilisation. Dans le cas de GLIC, la première réponse enregistrée, suite à l'application de proton, est quasi-systématiquement plus importante que les réponses suivantes (Figure 1). Ainsi, en effectuant quelques applications successives, on peut facilement estimer le pourcentage de variation, dans l'intensité des courants, suivant la cellule particulière testée. Dans le cas de GLIC, cette fluctuation est de l'ordre de 5% pour le récepteur sauvage, ainsi, tous les composés entraînant un impact fonctionnel de 5% ou inférieur sont considérés comme « inactifs ».

Des cinq dérivés MTS testés, seul le 4-(Hydroxy methyl)benzyl methanethiosulfonate (composé n°4) a entraîné une inhibition à hauteur de 20% des courants de GLIC (Figure 1 et Table 1). Cette inhibition étant toujours visible après rinçage de la cellule, cela laisse à penser que le composé a effectivement réagit avec la cystéine. Cependant, l'application d'une solution de DTT sur les ovocytes ne permet pas systématiquement de reverser cet effet et les mesures de l'inhibition elle-mêmes sont très variables. De plus, le même protocole appliqué sur des ovocytes exprimant les récepteurs GLIC sans la cystéine endogène montre des résultats identiques. Ainsi, l'effet enregistré ne peut pas être relié à une occupation de la poche intra-sandwich, ni à une réaction avec la cystéine endogène.

Composé	Structure	Concentration testée	Effet sur la fonction	n
Methyl methanethiosulfonate (MMTS)		100µM	(-) 5%	1
(2-(trimethylammonium)ethyl) methanethiosulfonate (MTSET)		100µM	0	1

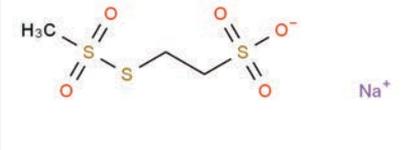
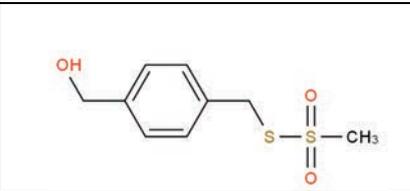
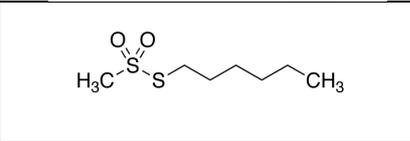
Sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate (MTSES)		100µM	0	1
4-(Hydroxy methyl)benzyl methanethiosulfonate		100µM	(-) 21±15%	4
Hexyl methanethiosulfonate		100µM	(-) <5%	2

Table 1 : Récapitulatif des dérivés de MTS testés et leurs effets sur la fonction de GLIC. Le signe (-) indique que la variation est une diminution du courant.

4.4 Identification des cavités et crible virtuel

La structure de GLIC à pH7 a été obtenue à faible résolution (4,35Å) et la plupart des chaînes latérales des acides aminés formant la poche intra-sandwich ne sont pas visibles. Nathan Desdouits de l'unité de M. Nilges (et A. Blondel) a reconstruit virtuellement ces chaînes et étudié cette poche à l'aide du programme mkgrip, développé au sein de leur laboratoire. Ce programme identifie des cavités en faisant circuler deux sondes sphériques dans la structure de la protéine, une de petit volume (dans notre cas 1,1Å de diamètre) qui permet d'identifier toutes les cavités et une de plus gros volume utilisée pour éliminer les zones très accessibles au solvant ou les cavités larges en périphérie des protéines, prédites peu spécifiques pour un ligand. Ainsi, il a pu identifier 4 cavités au sein de cette poche intra-sandwich (Figure 2).

Notons que pour la reconstruction des chaînes latérales non définies dans la densité électronique, N. Desdouits a été amené à générer plus de 20'000 nouvelles structures d'un monomère, et les 3 premières cavités sont présentées sur ces nouvelles structures. Seule la cavité 4 a été obtenue sur un monomère résolu par cristallographie.

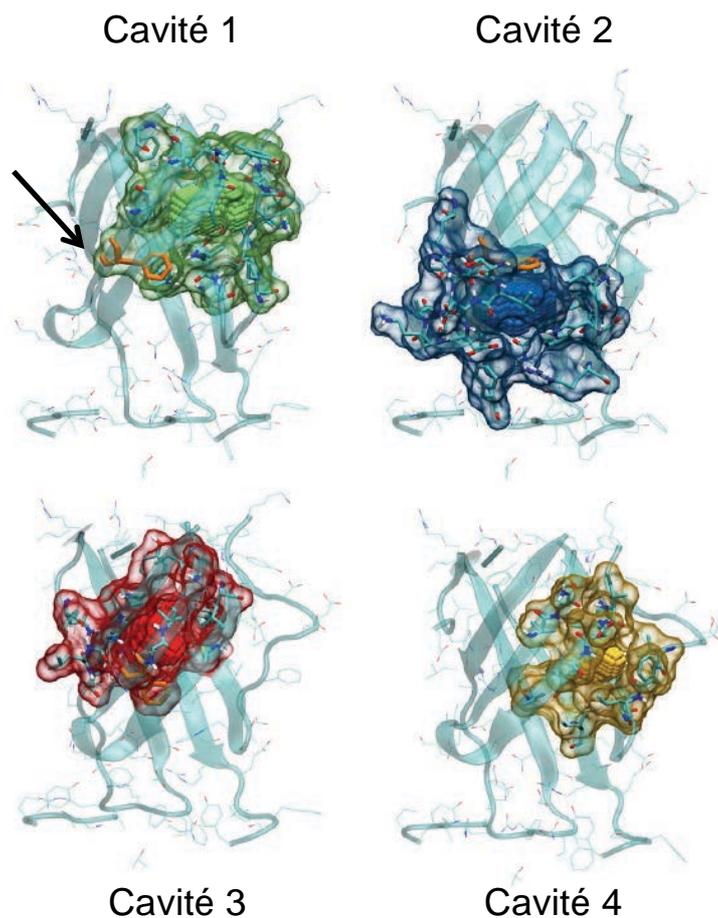


Figure 2 : Cavités intra-sandwich de GLIC. La figure présente les quatre cavités identifiées par mkgrid. Ces quatre cavités se différencient, entre autres, par leur position relative à l'acide aminé F37 indiqué par une flèche. Les acides aminés bordant chacune des cavités sont représentés en bâtons et leur surface colorée, les cavités sont quant à elles représentées par des sphères opaques.

Il a par la suite réalisé un crible virtuel de composés présents dans la méta-chemobibliothèque ZINC, en deux étapes : 1) partitionnement des 10 millions de composés de la ZINC en groupes par l'utilisation de réseaux neuronaux, et crible virtuel des 4 cavités par un composé représentatif de chaque groupe, 2) lorsqu'un composé donne un bon score, un nouveau crible est effectué avec tous les composés de son groupe.

Les cribles virtuels, ou docking, ont été effectués avec deux logiciels, FlexX et DOCK, et les composés ayant les meilleurs scores ont été sélectionnés pour le crible par électrophysiologie. Pour le choix des composés, une attention particulière a été apportée à tester un nombre

égal de composé pour chaque cavité et à enlever tous les composés portant des fonctions titrables dans les gammes de pH utilisées pour activer GLIC, afin de simplifier l'analyse.

4.5 Test des composés sélectionnés par le crible virtuel

4.5.1 Remarques d'ordre technique

- Les modulateurs allostériques sont des composés influençant la fonction des récepteurs lorsqu'ils sont en présence d'agoniste (ou d'antagoniste) en déplaçant l'équilibre entre deux états (Christopoulos et al., 2014). Un modulateur est dit positif (« positive allosteric modulator » ou PAM) s'il déplace l'équilibre vers l'état actif, ou dit négatif (« negative allosteric modulator » ou NAM) s'il le déplace vers un état présentant un canal fermé. Afin de pouvoir mesurer l'effet le plus fort d'un modulateur, il convient donc de se placer dans des conditions où l'équilibre n'est pas déjà fortement déplacé vers l'un ou l'autre de ces états. Ainsi, tous les composés présentés dans cette partie ont été testés en co-application d'agoniste à l'EC₃₀ (concentration pour laquelle 30% des récepteurs sont actifs), c'est à dire à pH5,5 (Howard et al., 2011).
- Pour des raisons tant économiques (prix d'achat de plus de 50 composés) que pratiques (molécules difficiles à synthétiser ou non disponibles en grandes quantités), nous ne possédons en général qu'une petite quantité de chacun des composés à tester. Ce point force l'utilisation d'un protocole de test où l'agoniste est perfusé en continu et les composés testés par de brèves co-applications. Ainsi, on peut facilement imaginer que l'effet de certains inhibiteurs puisse être diminué ou totalement masqué car la cavité ciblée par ces molécules n'est pas « accessible » dans les conditions du test. Cependant, cela permet également de mieux sélectionner des composés ayant une affinité suffisante pour déplacer l'équilibre

même dans des conditions à priori moins favorables. Toutefois, il serait intéressant, pour les inhibiteurs identifiés, de réaliser des tests complémentaires avec des périodes de pré-incubation des ovocytes en présence de l'inhibiteur suivies par une co-application d'agoniste et d'inhibiteur afin de mesurer son réel impact sur les courants, et les transitions de GLIC.

- La plupart des composés n'étant solubles à forte concentration que dans le Diméthylsulfoxyde (DMSO), cela implique que chaque test soit réalisé en présence d'une deuxième molécule, le DMSO. J'ai donc testé son effet sur la fonction de GLIC (Figure 3).

Le DMSO est inhibiteur à hautes concentrations (130mM-13mM) et potentialisateur à plus faibles concentrations (1mM), avec cependant de larges variations d'une mesure à l'autre. D'un point de vue pharmacologique, la molécule n'est pas très affine mais le DMSO étant nécessaire à haute concentration pour solubiliser les composés, cet effet n'est pas négligeable. Pour faciliter l'analyse, toutes les expériences ont été réalisées en perfusion continue de DMSO au pourcentage utilisé pour solubiliser le composé testé.

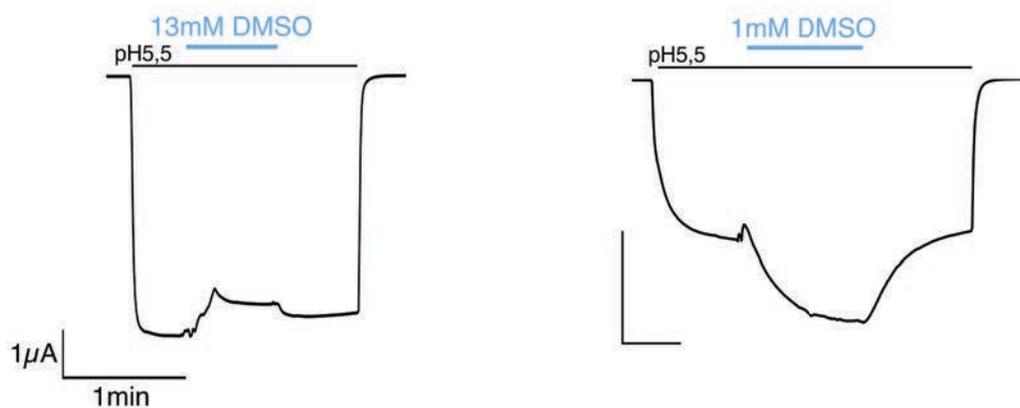


Figure 3 : Effet du DMSO sur les courants de GLIC. La trace de gauche montre l'effet inhibiteur du DMSO et la trace de droite l'effet potentialisateur. Les valeurs d'échelle sont identiques sur les deux traces.

4.5.2 Identification de composés inhibiteurs

Les tests fonctionnels ont révélés plusieurs composés inhibiteurs de GLIC. La plupart ont montré des effets modérés avec une inhibition nulle ou inférieure à 10% (Tables 3 et 4). Toutefois, deux composés, n°3 et n°4, ont entraîné une inhibition plus importante, jusqu'à 16% (Figure 4 et Table 2). Cependant, cette inhibition n'a pu être enregistrée qu'à des concentrations très élevées (1mM) indiquant une très faible affinité de ces molécules pour GLIC.

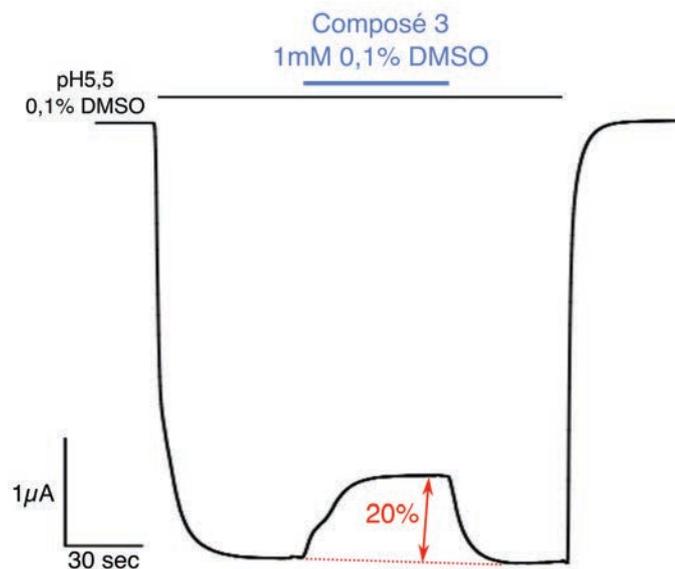


Figure 4 : Tracé électrophysiologique représentatif de l'effet du composé n°3. L'ovocyte est perfusé par une solution d'agoniste à pH5,5 + 0,1% DMSO, puis le composé n°3 est co-appliqué à une concentration de 1mM + 0,1% DMSO. La cellule est ensuite rincée par la solution d'agoniste seule. L'effet du composé est mesuré par la perte de courant entre les deux points pré et post application.

Il est toutefois intéressant de noter que, de tous les composés testés, seuls ceux ciblant les cavités 1 et 2 ont permis d'enregistrer des effets, les composés ciblant la cavité 4 n'entraînant aucune modification du courant. Cette observation pourrait indiquer une différence d'accessibilité entre ces cavités.

4.5.3 Identification de composés potentialisateurs

De façon surprenante, les composés n°1 et n°2, sélectionnés car prédits pour stabiliser l'état de repos, s'avèrent avoir un effet potentialisateur des courants de GLIC, entraînant une augmentation de 36% et 22% respectivement (Table 2 et Figure 5). Notons d'ailleurs qu'une particularité de ces deux composés est que le temps de rinçage nécessaire à la disparition de leur effet est long (Figure 5).

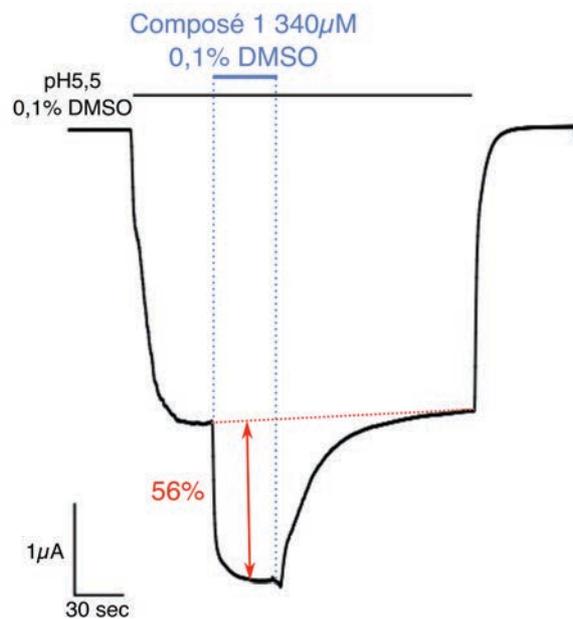


Figure 5 : Tracé électrophysiologique montrant l'effet du composé n°1. Cette trace est celle montrant le plus fort effet du composé afin d'illustrer le temps de rinçage nécessaire pour laver le composé. L'ovocyte est perfusé par une solution d'agoniste à pH5,5 + 0,1% DMSO, puis le composé n°1 est co-appliqué à une concentration de 340µM + 0,1% DMSO. La cellule est ensuite rincée par la solution d'agoniste seule. L'effet du composé est mesuré par l'augmentation de courant entre les plateaux de courant pré et post application.

De plus, le composé n°1 présente une structure similaire au PNU-120,596 (Table 4), un potentialisateur très puissant du récepteur nicotinique $\alpha 7$ (Young et al., 2008). Le PNU a donc été testé sur GLIC mais n'a pas d'effet modulateur, et de la même façon, le composé n°25 (Table 4), partageant également une structure similaire au composé n°1, n'a pas

d'effet sur la fonction de GLIC, ce qui suggère une forte spécificité structurale.

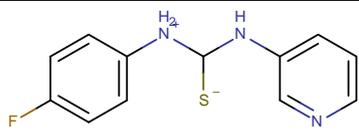
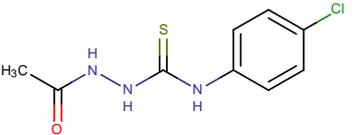
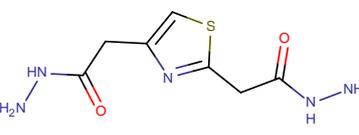
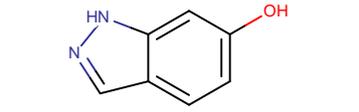
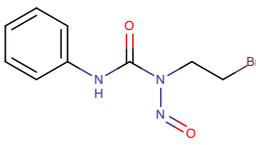
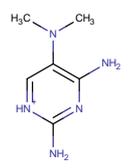
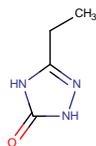
N°	Composé	Cavité ciblée	Concentrations testée	Effet sur la fonction	n
1		1	340µM	(+) 35,8%	5
			34µM	(+) 17%	2
2		1	500µM	(+) 22,1%	3
			50µM	< (+) 2%	1
3		1	1mM	(-) 16,4%	3
			100µM	(-) 5,4%	1
4		2	1mM	(-) 16%	1

Table 2 : Composés testés ayant les effets les plus prononcés sur la fonction de GLIC.

Le signe (-) indique que la variation est une diminution du courant et (+) indique une augmentation du courant.

N°	Composé	Cavité ciblée	Concentrations testée	Effet sur la fonction	n
5		1	100µM	(-) 8,5%	2
			10µM	(-) 9%	1
6		2	500µM	(-) 10,3%	2
			100µM	< (-) 2%	2
7		2	500µM	(-) 8,1%	2
			100µM	< (-) 2%	1

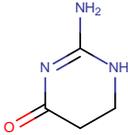
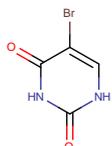
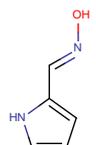
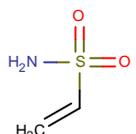
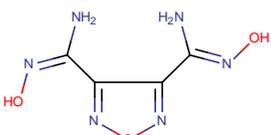
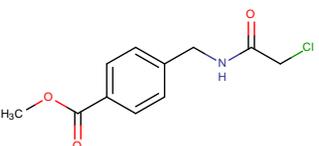
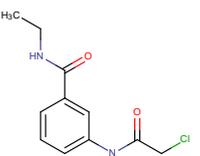
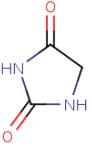
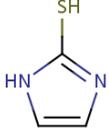
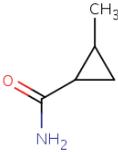
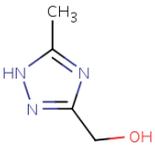
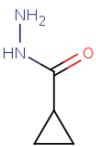
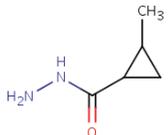
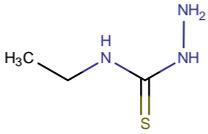
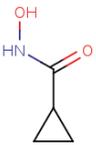
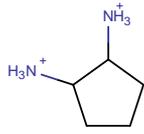
8		2	100µM	(-) 4,4%	1
9		2	500µM 100µM	(-) 4,5% < (-) 2%	2 1
10		4	500µM 100µM	< (-) 5% < (-) 2%	2 3
11		4	1mM	(-) 6%	1
12		3	1mM	(-) 5,3%	1
13		1	1mM	(-) 4,7%	1
14		1	1mM	(-) 4%	1

Table 3 : Composés testés ayant un faible effet sur la fonction de GLIC. Le signe (-) indique que la variation est une diminution du courant.

N°	Composé	Cavité ciblée	Concentrations testée	Effet sur la fonction	n
15		4	1mM	0	1
16		1	1mM	0	1
17		3	1mM	0	1
18		4	1mM	0	1
19		1	1mM	0	2
20		4	1mM	0	2
21		4	1mM	< (-) 2%	1
22		4	1mM	< (-) 2%	2
23		2	1mM	< (-) 5%	1

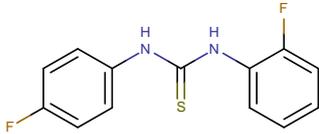
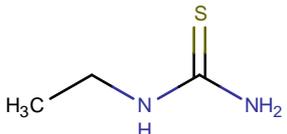
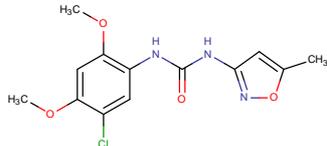
24		3	50µM	0	2
25		1	340µM	0	1
26		4	500µM	< (-) 2%	1
PNU-120, 596			10µM	0	2

Table 4 : Composés testés n'ayant pas d'effet sur la fonction de GLIC. Le signe (-) indique que la variation est une diminution du courant.

4.6 Conclusions et expériences futures

L'étude de la structure de GLIC à pH7 a permis d'identifier une cavité à l'interface entre les deux feuillets β du domaine extracellulaire, dénommée cavité intra-sandwich (Sauguet et al., 2014). Cette cavité voit son volume largement réduit lors de l'activation et du mouvement de contraction du domaine extracellulaire, et apparaît donc comme une cible intéressante pour l'identification d'inhibiteurs de la fonction de GLIC. De plus, une étude du récepteur bactérien ELIC, montrant qu'il est inhibé par le bromoforme, a permis son identification par cristallographie au sein de cette poche intra-sandwich (Spurny et al., 2013).

Le crible virtuel, réalisé par Nathan Desdouits a permis d'identifier les 27 composés testés dans cette étude. Sur l'ensemble des composés testés par électrophysiologie, la plupart n'ont pas entraîné de modulation de la fonction de GLIC, toutefois, quatre composés ont pu être caractérisés, deux inhibiteurs et deux potentialisateurs. L'identification de potentialisateurs à l'issu d'un crible ciblant une cavité de modulation

négative est particulièrement surprenante et laisse supposer qu'ils se lient à un site distinct. Les cinétiques longues de rinçage du composé pourraient indiquer qu'ils se lient au sein d'une cavité très enfouie, comme cela pourrait être le cas pour la cavité n°1, mais également pour des poches situées au sein du domaine transmembranaire. En effet, le composé n°1 possède une similarité structurale avec le PNU 120,596, un puissant potentialisateur du récepteur nicotinique $\alpha 7$, dont le site de liaison a été identifié au sein du domaine transmembranaire (Young et al., 2008). Notons cependant qu'une cinétique de rinçage lente peut également être mesurée avec des composés ayant une très forte affinité pour leur site, cette hypothèse semble toutefois peu probable pour ces deux composés étant donné qu'ils ne sont potentialisateurs qu'à fortes concentrations (centaines de mM).

Cette faible affinité apparente est observée pour les quatre composés modulant GLIC. Ainsi, ils ont été utilisés comme base pour réaliser un second crible de la chimiothèque ZINC. Pour cette seconde sélection, la première classification par réseaux neuronaux a été utilisée afin d'identifier de nouvelles molécules de même famille chimique mais avec un filtre rejetant les molécules ne différant que par un ou deux groupes aux quatre composés initiaux. Sur cette première liste proposée par Nathan Desdouts, nous avons ensuite manuellement sélectionné des composés encore une fois non titrables, et favorisé ceux portant des groupements générant des signaux anomaux, pour faciliter de futures études cristallographiques.

Ces composés ont été commandés et seront testés dans les semaines suivant la rédaction de ce manuscrit.

Par la suite, il serait intéressant d'étudier les composés ciblant la poche intra-sandwich avec la technique de TrpIQ mise en place sur GLIC. En effet, une molécule inhibitrice peut tout autant stabiliser un état de repos, un intermédiaire d'activation ou encore un état désensibilisé. Ces états ne permettant pas le passage d'ions à la membrane, ils ne sont pas différenciables par électrophysiologie. Les senseurs fluorescents de GLIC

permettant de suivre l'activation, et plus encore, la pré-activation, la mesure de l'effet des inhibiteurs sur les variations de fluorescence permettra sûrement de répondre à ces questions.

En effet, j'ai déjà pu utiliser cette technique pour étudier l'effet d'un autre inhibiteur de GLIC, le propofol. Cet anesthésique général a été co-cristallisé au sein de la poche intra-membranaire de GLIC et inhibe le récepteur avec un $IC_{50}=24\mu\text{M}$ (Nury et al., 2011). Cependant, la co-cristallisation ayant été réalisée en présence d'agoniste (à pH4) et la structure obtenue étant celle, supposée, de l'état actif, ces études structurales ne permettent pas encore de conclure sur l'état stabilisé par ce composé.

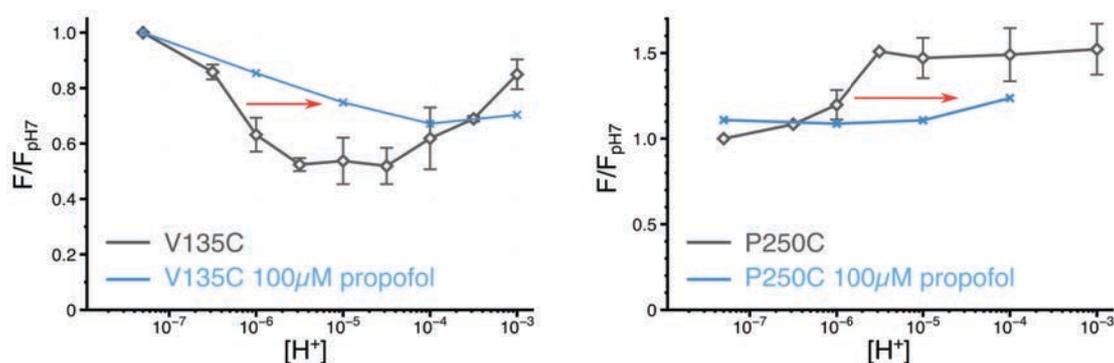


Figure 6 : Variations de fluorescence en présence de propofol. Toutes les valeurs de fluorescence sont normalisées sur la fluorescence à pH7 en absence de propofol. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Les mesures de fluorescence des mutants mBBR135 (haut de l'ECD) et mBBR250 (boucle M2-M3) en co-application de proton et de propofol à 100 μM , concentration pour laquelle on observe 100% d'inhibition, montrent un déplacement de la réponse en fluorescence vers les bas pH (Figure 6). Ainsi, cette observation suggère plutôt que l'action du propofol agit sur l'équilibre repos/pré-actif, en stabilisant l'état de repos. On peut également voir qu'à pH4, les valeurs de fluorescence des mutants sans et avec propofol sont proches, permettant de réconcilier les données sur les récepteurs en solution et les récepteurs au sein d'un cristal. En effet, l'impact fonctionnel du propofol étant plus marqué à hauts pH, l'application

d'une concentration saturante de l'agoniste (pH4) suggère que l'activation des récepteurs « prime » sur l'effet inhibiteur du propofol.

5. Discussion générale

Les données obtenues sur GLIC par la méthode Trp/Tyr IQ permettent de décrire les réorganisations structurales du récepteur libre de ses mouvements, lorsqu'il est solubilisé en détergent ou reconstitué dans une membrane modèle, en liposomes d'asolectine.

Ces données permettent de proposer un modèle général où l'activation s'effectue par un mouvement de contraction de l'ECD, un mouvement vers l'extérieur de la boucle M2-M3, un rapprochement des hélices M2 et M1 et enfin l'ouverture du pore. Par ailleurs, les études de mutagenèse présentées suggèrent que les interactions entre le pré-M1 et la boucle M2-M3 sont essentielles au maintien de sa position vers l'extérieur, et donc à la stabilisation de l'état actif. Enfin, la désensibilisation apparaît comme une continuation des mouvements observés au cours de l'activation, particulièrement au niveau de la boucle M2-M3 et du haut du domaine extracellulaire. Ici encore, les études de mutagenèse pointent vers un rôle essentiel des interactions pré-M1 et boucle M2-M3 dans la stabilisation de cet état.

La combinaison des études de fluorescence à l'équilibre et en temps réel, comparées aux mesures électrophysiologiques, permet également d'identifier et de caractériser un état de pré-activation de GLIC. Cet état apparaît structuralement proche de l'état actif dans le chemin d'activation. En effet, il est caractérisé par la contraction quaternaire de l'ECD, la position vers l'extérieur de la boucle M2-M3, et, dans le haut du TMD, le rapprochement des hélices M2 et M1 ; seul le pore, du moins les « portes » d'activation, restent fermées. La technique Trp/Tyr fournit ainsi une image dynamique des transitions de GLIC, en dehors du cristal et dans des environnements membranaires plus physiologiques.

De façon remarquable, les études effectuées par REFER sur le récepteur nicotinique musculaire suggèrent que le site orthostérique, dans le haut de l'ECD, et la boucle M2-M3 bougent précocement au cours de l'activation

(Purohit et al., 2013), suggérant que le mécanisme de pré-activation décrit pour GLIC pourrait être valable pour des récepteurs eucaryotes. En effet, des études électrophysiologiques des récepteurs nicotinique et à la glycine ont identifié qu'il existait un ou plusieurs états de pré-activation (Lape et al., 2008; Mukhtasimova et al., 2009). Ces études fonctionnelles ne permettant pas une description structurale de ces états, les données obtenues sur GLIC fournissent ainsi un modèle structural solide pour l'étude de diverses classes de récepteurs humains.

Cependant, nos expériences en temps réel sont limitées par le temps mort de l'appareil de 2 millisecondes, alors qu'il est probable que la transition de pré-activation se fasse par des événements très précoces non résolus ici. En effet, une étude par dynamique moléculaire d'une microseconde, étudiant la désactivation d'un récepteur GLIC unique, suggère que certains événements de cette transition sont particulièrement rapides, de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanosecondes, et impliquent des mouvements asymétriques des hélices formant le pore suivant deux étapes séquentielles (Nury et al., 2010).

Ainsi, d'autres techniques seront nécessaires pour mesurer les mouvements structuraux associés à cette phase très rapide de pré-activation. On peut notamment citer le « Temperature-Jump » (T-jump), fournissant une résolution de l'ordre de la microseconde, que nous avons commencé à utiliser pour l'étude de GLIC. De plus, diverses études ont récemment été publiées utilisant la fluorescence pour suivre, en temps réel, les réorganisations de protéines uniques en solutions ou reconstituées en liposomes (Akyuz et al., 2015; Olofsson et al., 2014). Enfin, on peut également citer le développement de la microscopie électronique en 4 dimensions, encore peu appliquée à la biologie, qui combine des variations de températures par T-jump et une acquisition stroboscopique de clichés de diffraction permettant de suivre, à haute résolution, les mouvements effectués par l'échantillon avec une résolution temporelle de la nanoseconde (Kwon et al., 2011). Ces différentes méthodes ont une haute sensibilité temporelle et leur adaptation à l'étude des RCPs sera nécessaire pour une meilleure compréhension des

événements structuraux amenant à la stabilisation de l'état actif d'un récepteur unique.

Cependant, les études structurales par fluorescence, et notamment le Trp/Tyr IQ, présentent déjà de nombreux avantages, tel que la possibilité d'observer directement les états fonctionnellement silencieux, c'est à dire présentant un pore non conductant pour les ions, impossible par électrophysiologie. Par exemple, les mesures préliminaires de fluorescence effectuées en présence de propofol, un anesthésique modulateur des RCPs et de GLIC pour qui il est inhibiteur (Nury et al., 2011), ont déjà permis d'identifier qu'il agit sur l'équilibre repos-actif et non actif-désensibilisé. De même, dans le cas de la picrotoxine, utilisée pour révéler la désensibilisation de GLIC, ce sont des modèles allostériques élaborés pour les récepteurs à la glycine et GABA_A qui proposent que ce bloquant joue sur l'équilibre A-D en favorisant l'état A (Gielen et al., 2015). En réalisant des enregistrements de fluorescence en présence de picrotoxine, on pourrait directement suivre, et confirmer, que ce bloquant agit sur cet équilibre.

Mais plus encore, au delà de la compréhension des effets des modulateurs, les mécanismes par lesquels une simple mutation peut modifier les équilibres allostériques des RCPs sont souvent difficiles à examiner par électrophysiologie. C'est particulièrement le cas des mutations impliquées dans le développement de l'hyperekplexia (GlyR) ou des épilepsies (GABA_AR), qui entraînent très souvent une perte de fonction des récepteurs (Bode and Lynch, 2014; Macdonald et al., 2010). En effet, une mutation entraînant une diminution de courant à la membrane peut tout autant favoriser un des états désensibilisés (rapide ou lent), que jouer sur l'équilibre repos/pré-actif ou encore pré-actif/actif. L'identification de l'état stabilisé est donc capitale pour comprendre les mécanismes de mutations pathologiques et pour développer de nouveaux agents pharmacologiques. La combinaison de l'étude structurale par fluorescence et mutagenèse de GLIC, qui pourra être étendue à d'autres RCPs, permettront sans doute d'apporter des réponses à ces questions,

et d'enrichir la compréhension des mécanismes impliqués dans les channelopathies.

Enfin, au delà de l'étude directe des réorganisations structurales de la superfamille des RCPs, il reste encore de grandes inconnues sur les interactions que ces récepteurs effectuent avec leur environnement et comment ces interactions influencent leurs transitions allostériques. Par exemple, les modifications post-traductionnelles au sein du domaine intracellulaire des récepteurs nicotiques et à la glycine sont suspectées d'influencer le comportement des récepteurs à la synapse, par la modifications des équilibres allostériques et notamment la désensibilisation (Krishnaswamy and Cooper, 2012; Papke and Grosman, 2014; Swope et al., 1999). Plus encore, le suivi de molécules uniques à la synapse de neurones a montré un rôle de la conformation des récepteurs GABA_A dans leur diffusion à la membrane. En effet, en présence d'agoniste la diffusion membranaire des récepteurs est augmentée et leur quantité totale diminuée, alors que l'application d'antagoniste les stabilise à la synapse (Gouzer et al., 2014).

Pour étudier plus encore ces questions, la fluorescence se révèle être un outil prometteur, notamment par l'utilisation de rapporteurs fluorescents de la conformation et la possibilité de leur suivit en direct à la membrane de cellules vivantes. Mais pour aller plus loin dans l'étude intégrative des RCPs, le développement de la méthode « cLEM » (Correlative Light-Electron Microscopy), qui permet de combiner l'étude de processus cellulaires dynamiques sur cellules vivantes, par fluorescence, et leur corrélation à des études structurales de haute résolution par cryo-microscopie, semble particulièrement puissante (Hanein and Volkmann, 2011).

En conclusion, le travail présenté dans cette thèse permet d'affiner les modèles de transitions proposés pour le récepteur-canal procaryote GLIC et d'apporter une dimension dynamique aux études structurales. La méthode Trp/Tyr IQ a de multiples applications pour l'exploration des mécanismes de transitions allostériques de la superfamille des RCPs, leur

modulation par des agents pharmacologiques exogènes et leur rôle dans le développement de pathologies.

V. Bibliographie

- Akk, G., Li, P., Bracamontes, J., Wang, M., Steinbach, J.H., 2011. Pharmacology of structural changes at the GABAA receptor transmitter binding site. *Br. J. Pharmacol.* 162, 840–850. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01083.x
- Akk, G., Steinbach, J.H., 2011. Structural Studies of the Actions of Anesthetic Drugs on the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor. *Anesthesiology* 115, 1338–1348. doi:10.1097/ALN.0b013e3182315d93
- Akyuz, N., Georgieva, E.R., Zhou, Z., Stolzenberg, S., Cuendet, M.A., Khelashvili, G., Altman, R.B., Terry, D.S., Freed, J.H., Weinstein, H., Boudker, O., Blanchard, S.C., 2015. Transport domain unlocking sets the uptake rate of an aspartate transporter. *Nature* 518, 68–73. doi:10.1038/nature14158
- Alam, S., Loughton, D.L., Walding, A., Wolstenholme, A.J., 2006. Human peripheral blood mononuclear cells express GABAA receptor subunits. *Mol. Immunol.* 43, 1432–42. doi:10.1016/j.molimm.2005.07.025
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., Rogers, S.W., 2009. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* 89, 73–120. doi:10.1152/physrev.00015.2008
- Althoff, T., Hibbs, R.E., Banerjee, S., Gouaux, E., 2014. X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* 512, 333–337. doi:10.1038/nature13669
- Auerbach, A., 2012. Thinking in cycles: MWC is a good model for acetylcholine receptor-channels. *J. Physiol.* 590, 93–8. doi:10.1113/jphysiol.2011.214684
- Auerbach, A., 2010. The gating isomerization of neuromuscular acetylcholine receptors. *J. Physiol.* 588, 573–86. doi:10.1113/jphysiol.2009.182774
- Auerbach, A., Akk, G., 1998. Desensitization of Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels. *J. Gen. Physiol.* 112, 181–197.
- Barrantes, F.J., 2014. Cell-surface translational dynamics of nicotinic acetylcholine receptors. *Front. Synaptic Neurosci.* 6, 25. doi:10.3389/fnsyn.2014.00025
- Beamer, E., Göllöncsér, F., Horváth, G., Bekő, K., Otrókoci, L., Koványi, B.,

- Sperlágh, B., 2015. Purinergic mechanisms in neuroinflammation: An update from molecules to behavior. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.09.019
- Beckmann, J., Lips, K.S., 2013. The non-neuronal cholinergic system in health and disease. *Pharmacology* 92, 286–302. doi:10.1159/000355835
- Beg, A.A., Ernstrom, G.G., Nix, P., Davis, M.W., Jorgensen, E.M., 2008. Protons act as a transmitter for muscle contraction in *C. elegans*. *Cell* 132, 149–60. doi:10.1016/j.cell.2007.10.058
- Bertaccini, E.J., Lindahl, E., Sixma, T., Trudell, J.R., 2008. Effect of cobratoxin binding on the normal mode vibration within acetylcholine binding protein. *J. Chem. Inf. Model.* 48, 855–60. doi:10.1021/ci700456s
- Bertrand, S., Devillers-Thiéry, A., Palma, E., Buisson, B., Edelstein, S.J., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1997. Paradoxical allosteric effects of competitive inhibitors on neuronal alpha7 nicotinic receptor mutants. *Neuroreport* 8, 3591–6.
- Betz, H., Laube, B., 2006. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* 97, 1600–10. doi:10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2009. X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457, 111–114. doi:10.1038/nature07462
- Bocquet, N., Prado de Carvalho, L., Cartaud, J., Neyton, J., Le Poupon, C., Taly, A., Grutter, T., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., 2007. A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445, 116–119. doi:10.1038/nature05371
- Bode, A., Lynch, J.W., 2014. The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol. Brain* 7, 2. doi:10.1186/1756-6606-7-2
- Bode, A., Wood, S.-E., Mullins, J.G.L., Keramidas, A., Cushion, T.D., Thomas, R.H., Pickrell, W.O., Drew, C.J.G., Masri, A., Jones, E.A., Vassallo, G., Born, A.P., Alehan, F., Aharoni, S., Bannasch, G., Bartsch, M., Kara, B., Krause, A., Karam, E.G., Matta, S., Jain, V., Mandel, H., Freilinger, M., Graham, G.E., Hobson, E., Chatfield, S., Vincent-Delorme, C., Rahme,

- J.E., Afawi, Z., Berkovic, S.F., Howell, O.W., Vanbellinghen, J.-F., Rees, M.I., Chung, S.-K., Lynch, J.W., 2013. New hyperekplexia mutations provide insight into glycine receptor assembly, trafficking, and activation mechanisms. *J. Biol. Chem.* 288, 33745–59. doi:10.1074/jbc.M113.509240
- Bondarenko, V., Mowrey, D., Tillman, T., Cui, T., Liu, L.T., Xu, Y., Tang, P., 2012. NMR structures of the transmembrane domains of the $\alpha 4\beta 2$ nAChR. *Biochim. Biophys. Acta* 1818, 1261–8. doi:10.1016/j.bbamem.2012.02.008
- Bondarenko, V., Tillman, T., Xu, Y., Tang, P., 2010. NMR structure of the transmembrane domain of the n-acetylcholine receptor beta2 subunit. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1608–14. doi:10.1016/j.bbamem.2010.04.014
- Bormann, J., Hamill, O.P., Sakmann, B., 1987. Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *J. Physiol.* 385, 243–286. doi:10.1113/jphysiol.1987.sp016493
- Braat, S., Kooy, R.F., 2015. The GABAA Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 86, 1119–1130. doi:10.1016/j.neuron.2015.03.042
- Bradley, R.J., Sterz, R., Peper, K., 1984. The effects of alcohols and diols at the nicotinic acetylcholine receptor of the neuromuscular junction. *Brain Res.* 295, 101–112. doi:10.1016/0006-8993(84)90820-5
- Brannigan, G., Hénin, J., Law, R., Eckenhoff, R., Klein, M.L., 2008. Embedded cholesterol in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14418–23. doi:10.1073/pnas.0803029105
- Breitinger, H.G., 2001. Fast kinetic analysis of ligand-gated ion channels. *Neuroscientist* 7, 95–103.
- Burnstock, G., Kennedy, C., 2011. P2X receptors in health and disease. *Adv. Pharmacol.* 61, 333–72. doi:10.1016/B978-0-12-385526-8.00011-4
- Burzomato, V., Beato, M., Groot-Kormelink, P.J., Colquhoun, D., Sivilotti, L.G., 2004. Single-channel behavior of heteromeric $\alpha 1\beta$ glycine receptors: an attempt to detect a conformational change before the channel opens. *J. Neurosci.* 24, 10924–40. doi:10.1523/JNEUROSCI.3424-04.2004
- Calimet, N., Simoes, M., Changeux, J.-P., Karplus, M., Taly, A., Cecchini, M., 2013. A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. 110, E3987–E3996. doi:10.1073/pnas.1313785110
- Carswell, C.L., Hénault, C.M., Murlidaran, S., Therien, J.P.D., Juranka, P.F., Surujballi, J.A., Brannigan, G., Baenziger, J.E., 2015. Role of the Fourth Transmembrane α Helix in the Allosteric Modulation of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Structure* 23, 1655–64. doi:10.1016/j.str.2015.06.020
- Chakrapani, S., 2015. EPR Studies of Gating Mechanisms in Ion Channels. *Methods Enzymol.* 557, 279–306. doi:10.1016/bs.mie.2014.12.030
- Chakrapani, S., Auerbach, A., 2005. A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 87–92. doi:10.1073/pnas.0406777102
- Chakrapani, S., Bailey, T.D., Auerbach, A., 2004. Gating dynamics of the acetylcholine receptor extracellular domain. *J. Gen. Physiol.* 123, 341–56. doi:10.1085/jgp.200309004
- Chandley, M.J., Miller, M.N., Kwasigroch, C.N., Wilson, T.D., Miller, B.E., 2009. Increased antibodies for the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic receptor in schizophrenia. *Schizophr. Res.* 109, 98–101. doi:10.1016/j.schres.2009.01.023
- Chang, Y., Weiss, D.S., 1999. Allosteric Activation Mechanism of the $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Revealed by Mutation of the Conserved M2 Leucine. *Biophys. J.* 77, 2542–2551. doi:10.1016/S0006-3495(99)77089-X
- Chasapis, C.T., Argyriou, A.I., Corringer, P.-J., Bentrop, D., Spyroulias, G.A., 2011. Unravelling the conformational plasticity of the extracellular domain of a prokaryotic nAChR homologue in solution by NMR. *Biochemistry* 50, 9681–3. doi:10.1021/bi201223u
- Chater, T.E., Goda, Y., 2014. The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 401. doi:10.3389/fncel.2014.00401
- Cheng, X., Ivanov, I., Wang, H., Sine, S.M., McCammon, J.A., 2009. Molecular-dynamics simulations of ELIC—a prokaryotic homologue of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 96, 4502–13. doi:10.1016/j.bpj.2009.03.018
- Cheng, X., Lu, B., Grant, B., Law, R.J., McCammon, J.A., 2006. Channel opening motion of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as suggested by

- normal mode analysis. *J. Mol. Biol.* 355, 310–24.
doi:10.1016/j.jmb.2005.10.039
- Chilian, B., Abdollahpour, H., Bierhals, T., Haltrich, I., Fekete, G., Nagel, I., Rosenberger, G., Kutsche, K., 2013. Dysfunction of SHANK2 and CHRNA7 in a patient with intellectual disability and language impairment supports genetic epistasis of the two loci. *Clin. Genet.* 84, 560–5.
doi:10.1111/cge.12105
- Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidlowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.-P., Sexton, P.M., Kenakin, T.P., Ehler, F.J., Spedding, M., Langmead, C.J., 2014. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allosterism and allosteric ligands. *Pharmacol. Rev.* 66, 918–47.
doi:10.1124/pr.114.008862
- Chung, S.-K., Vanbellinghen, J.-F., Mullins, J.G.L., Robinson, A., Hantke, J., Hammond, C.L., Gilbert, D.F., Freilinger, M., Ryan, M., Kruer, M.C., Masri, A., Gurses, C., Ferrie, C., Harvey, K., Shiang, R., Christodoulou, J., Andermann, F., Andermann, E., Thomas, R.H., Harvey, R.J., Lynch, J.W., Rees, M.I., 2010. Pathophysiological mechanisms of dominant and recessive GLRA1 mutations in hyperekplexia. *J. Neurosci.* 30, 9612–20.
doi:10.1523/JNEUROSCI.1763-10.2010
- Cockcroft, V.B., Osguthorpe, D.J., Barnard, E.A., Friday, A.E., Lunt, G.G., 1995. Ligand-gated ion channels. Homology and diversity. *Mol. Neurobiol.* 4, 129–69. doi:10.1007/BF02780338
- Collingridge, G.L., Olsen, R.W., Peters, J., Spedding, M., 2009. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 56, 2–5.
doi:10.1016/j.neuropharm.2008.06.063
- Corringer, P.J., Bertrand, S., Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1999. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 22, 831–43.
- Cui, T., Mowrey, D., Bondarenko, V., Tillman, T., Ma, D., Landrum, E., Perez-Aguilar, J.M., He, J., Wang, W., Saven, J.G., Eckenhoff, R.G., Tang, P., Xu, Y., 2012. NMR structure and dynamics of a designed water-soluble transmembrane domain of nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim.*

- Biophys. Acta 1818, 617–26. doi:10.1016/j.bbamem.2011.11.021
- Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van der Ploeg, L.H., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371, 707–11. doi:10.1038/371707a0
- Cymes, G.D., Grosman, C., Auerbach, A., 2002. Structure of the Transition State of Gating in the Acetylcholine Receptor Channel Pore: A Φ -Value Analysis †. *Biochemistry* 41, 5548–5555. doi:10.1021/bi011864f
- daCosta, C.J.B., Dey, L., Therien, J.P.D., Baenziger, J.E., 2013. A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem. Biol.* 9, 701–7. doi:10.1038/nchembio.1338
- Dani, J.A., Bertrand, D., 2007. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 699–729. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105214
- Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., Kirkness, E.F., 1999. The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397, 359–63. doi:10.1038/16941
- Davies, P.A., Wang, W., Hales, T.G., Kirkness, E.F., 2003. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn²⁺. *J. Biol. Chem.* 278, 712–7. doi:10.1074/jbc.M208814200
- De Planque, M.R.R., Rijkers, D.T.S., Liskamp, R.M.J., Separovic, F., 2004. The alphaM1 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor interacts strongly with model membranes. *Magn. Reson. Chem.* 42, 148–54. doi:10.1002/mrc.1326
- Dejanovic, B., Djemie, T., Gru newald, N., Suls, A., Kress, V., Hetsch, F., Craiu, D., Zemel, M., Gormley, P., Lal, D., Myers, C.T., Mefford, H.C., Palotie, A., Helbig, I., Meier, J.C., De Jonghe, P., Weckhuysen, S., Schwarz, G., 2015. Simultaneous impairment of neuronal and metabolic function of mutated gephyrin in a patient with epileptic encephalopathy. *EMBO Mol. Med.* 7, 1580–1594. doi:10.15252/emmm.201505323
- Del Castillo, J., Katz, B., 1957. Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* 146, 369–81.

- Dellisanti, C.D., Ghosh, B., Hanson, S.M., Raspanti, J.M., Grant, V.A., Diarra, G.M., Schuh, A.M., Satyshur, K., Klug, C.S., Czajkowski, C., 2013a. Site-Directed Spin Labeling Reveals Pentameric Ligand-Gated Ion Channel Gating Motions. *PLoS Biol.* 11. doi:10.1371/journal.pbio.1001714
- Dellisanti, C.D., Ghosh, B., Hanson, S.M., Raspanti, J.M., Grant, V.A., Diarra, G.M., Schuh, A.M., Satyshur, K., Klug, C.S., Czajkowski, C., 2013b. Site-Directed Spin Labeling Reveals Pentameric Ligand-Gated Ion Channel Gating Motions. *PLoS Biol.* 11, e1001714. doi:10.1371/journal.pbio.1001714
- Dent, J.A., 2010. The evolution of pentameric ligand-gated ion channels. *Adv. Exp. Med. Biol.* 683, 11–23.
- Dent, J.A., 2006. Evidence for a diverse Cys-loop ligand-gated ion channel superfamily in early bilateria. *J. Mol. Evol.* 62, 523–35. doi:10.1007/s00239-005-0018-2
- Doumazane, E., Scholler, P., Fabre, L., Zwier, J.M., Trinquet, E., Pin, J.-P., Rondard, P., 2013. Illuminating the activation mechanisms and allosteric properties of metabotropic glutamate receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, E1416–25. doi:10.1073/pnas.1215615110
- Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y., Gouaux, E., 2015. Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* 526, 224–229. doi:10.1038/nature14853
- Duret, G., Van Renterghem, C., Weng, Y., Prevost, M., Moraga-Cid, G., Huon, C., Sonner, J.M., Corringer, P.-J., 2011. Functional prokaryotic–eukaryotic chimera from the pentameric ligand-gated ion channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12143–12148. doi:10.1073/pnas.1104494108
- Durisic, N., Godin, A.G., Wever, C.M., Heyes, C.D., Lakadamyali, M., Dent, J.A., 2012. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J. Neurosci.* 32, 12915–20. doi:10.1523/JNEUROSCI.2050-12.2012
- Emerit, M.B., Baranowski, C., Diaz, J., Martinez, A., Areias, J., Alterio, J., Masson, J., Boué-Grabot, E., Darmon, M., 2016. A New Mechanism of Receptor Targeting by Interaction between Two Classes of Ligand-Gated Ion Channels. *J. Neurosci.* 36, 1456–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.2390-15.2016

- Fleck, M.W., Thomson, J.L., Hough, L.B., 2012. Histamine-gated ion channels in mammals? *Biochem. Pharmacol.* 83, 1127–35. doi:10.1016/j.bcp.2011.12.011
- Galligan, J.J., 2002. Ligand-gated ion channels in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol. Motil.* 14, 611–623. doi:10.1046/j.1365-2982.2002.00363.x
- Galzi, J.L., Bertrand, S., Corringer, P.J., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1996. Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J.* 15, 5824–32.
- Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J.P., Bertrand, D., 1992. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359, 500–5. doi:10.1038/359500a0
- Gielen, M., Thomas, P., Smart, T.G., 2015. The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nat. Commun.* 6, 6829. doi:10.1038/ncomms7829
- Gielen, M.C., Lumb, M.J., Smart, T.G., 2012. Benzodiazepines modulate GABAA receptors by regulating the preactivation step after GABA binding. *J. Neurosci.* 32, 5707–15. doi:10.1523/JNEUROSCI.5663-11.2012
- Gilhus, N.E., Verschuuren, J.J., 2015. Myasthenia gravis: subgroup classification and therapeutic strategies. *Lancet. Neurol.* 14, 1023–36. doi:10.1016/S1474-4422(15)00145-3
- Giniatullin, R., Nistri, A., Yakel, J.L., 2005. Desensitization of nicotinic ACh receptors: shaping cholinergic signaling. *Trends Neurosci.* 28, 371–8. doi:10.1016/j.tins.2005.04.009
- Gisselmann, G., Pusch, H., Hovemann, B.T., Hatt, H., 2002. Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nat. Neurosci.* 5, 11–2. doi:10.1038/nn787
- Gonzalez-Gutierrez, G., Cuello, L.G., Nair, S.K., Grosman, C., 2013. Gating of the proton-gated ion channel from *Gloeobacter violaceus* at pH 4 as revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201313156. doi:10.1073/pnas.1313156110
- Gonzalez-Gutierrez, G., Grosman, C., 2010. Bridging the Gap between Structural Models of Nicotinic Receptor Superfamily Ion Channels and

- Their Corresponding Functional States. *J. Mol. Biol.* 403, 693–705. doi:10.1016/j.jmb.2010.09.026
- Gonzalez-Gutierrez, G., Lukk, T., Agarwal, V., Papke, D., Nair, S.K., Grosman, C., 2012. Mutations that stabilize the open state of the *Erwinia chrisanthemi* ligand-gated ion channel fail to change the conformation of the pore domain in crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 6331–6. doi:10.1073/pnas.1119268109
- Gouzer, G., Specht, C.G., Allain, L., Shinoe, T., Triller, A., 2014. Benzodiazepine-dependent stabilization of GABA(A) receptors at synapses. *Mol. Cell. Neurosci.* 63, 101–13. doi:10.1016/j.mcn.2014.10.004
- Griffon, N., Büttner, C., Nicke, A., Kuhse, J., Schmalzing, G., Betz, H., 1999. Molecular determinants of glycine receptor subunit assembly. *EMBO J.* 18, 4711–21. doi:10.1093/emboj/18.17.4711
- Grosman, C., Zhou, M., Auerbach, A., 2000. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 403, 773–6. doi:10.1038/35001586
- Guzman, I., Ghaemi, Z., Baranger, A., Luthey-Schulten, Z., Gruebele, M., 2015. Native conformational dynamics of the spliceosomal U1A protein. *J. Phys. Chem. B* 119, 3651–61. doi:10.1021/jp511760m
- Habermacher, C., Dunning, K., Chataigneau, T., Grutter, T., 2015. Molecular structure and function of P2X receptors. *Neuropharmacology*. doi:10.1016/j.neuropharm.2015.07.032
- Hanein, D., Volkman, N., 2011. Correlative Light-Electron Microscopy, in: *Recent Advances in Electron Cryomicroscopy, Partie 2.* p. 136.
- Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Tol, M.B., Hovius, R., Graff, A., Stahlberg, H., Tomizaki, T., Desmyter, A., Moreau, C., Li, X.-D., Poitevin, F., Vogel, H., Nury, H., 2014. X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 512, 276–281. doi:10.1038/nature13552
- Hattori, M., Gouaux, E., 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485, 207–12. doi:10.1038/nature11010
- Hénault, C.M., Juranka, P.F., Baenziger, J.E., 2015. The M4 Transmembrane α -Helix Contributes Differently to Both the Maturation and Function of Two Prokaryotic Pentameric Ligand-gated Ion Channels. *J. Biol. Chem.* 290,

25118–28. doi:10.1074/jbc.M115.676833

- Hevers, W., Lüddens, H., 1998. The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol. Neurobiol.* 18, 35–86. doi:10.1007/BF02741459
- Hibbs, R.E., Gouaux, E., 2011. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474, 54–60. doi:10.1038/nature10139
- Hilf, R.J.C., Bertozzi, C., Zimmermann, I., Reiter, A., Trauner, D., Dutzler, R., 2010. Structural basis of open channel block in a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 1330–1336. doi:10.1038/nsmb.1933
- Hilf, R.J.C., Dutzler, R., 2009. Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457, 115–8. doi:10.1038/nature07461
- Hilf, R.J.C., Dutzler, R., 2008. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452, 375–379. doi:10.1038/nature06717
- Hoch, W., Betz, H., Becker, C.-M., 1989. Primary cultures of mouse spinal cord express the neonatal isoform of the inhibitory glycine receptor. *Neuron* 3, 339–348. doi:10.1016/0896-6273(89)90258-4
- Howard, R.J., Murail, S., Ondricek, K.E., Corringer, P.-J., Lindahl, E., Trudell, J.R., Harris, R.A., 2011. Structural basis for alcohol modulation of a pentameric ligand-gated ion channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 12149–12154. doi:10.1073/pnas.1104480108
- Huang, T.T., Kosower, N.S., Yanagimachi, R., 1984. Localization of thiol and disulfide groups in guinea pig spermatozoa during maturation and capacitation using bimane fluorescent labels. *Biol. Reprod.* 31, 797–809. doi:10.1095/biolreprod31.4.797
- Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., Shaffer, P.L., 2015. Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature* 526, 277–80. doi:10.1038/nature14972
- Islas, L.D., Zagotta, W.N., 2006. Short-range Molecular Rearrangements in Ion Channels Detected by Tryptophan Quenching of Bimane Fluorescence. *J. Gen. Physiol.* 128, 337–346. doi:10.1085/jgp.200609556
- Jackson, M.B., 1984. Spontaneous openings of the acetylcholine receptor

- channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 3901–4.
- Jaiteh, M., Taly, A., Hénin, J., 2016. Evolution of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels: Pro-Loop Receptors. *PLoS One* 11, e0151934. doi:10.1371/journal.pone.0151934
- Jayakar, S.S., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., Cohen, J.B., 2013. Identification of propofol binding sites in a nicotinic acetylcholine receptor with a photoreactive propofol analog. *J. Biol. Chem.* 288, 6178–89. doi:10.1074/jbc.M112.435909
- Jensen, A.A., Davies, P.A., Bräuner-Osborne, H., Krzywkowski, K., 2008. 3B but which 3B and that's just one of the questions: the heterogeneity of human 5-HT₃ receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 29, 437–44. doi:10.1016/j.tips.2008.06.001
- Jones Brunette, A.M., Farrens, D.L., 2014. Distance mapping in proteins using fluorescence spectroscopy: tyrosine, like tryptophan, quenches bimane fluorescence in a distance-dependent manner. *Biochemistry* 53, 6290–301. doi:10.1021/bi500493r
- Jones, M. V., Westbrook, G.L., 1996. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 19, 96–101. doi:10.1016/S0166-2236(96)80037-3
- Juneja, P., Horlacher, R., Bertrand, D., Krause, R., Marger, F., Welte, W., 2014. An internally modulated, thermostable, pH-sensitive Cys loop receptor from the hydrothermal vent worm *Alvinella pompejana*. *J. Biol. Chem.* 289, 15130–40. doi:10.1074/jbc.M113.525576
- Karakas, E., Furukawa, H., 2014. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* 344, 992–7. doi:10.1126/science.1251915
- Karnovsky, A.M., Gotow, L.F., McKinley, D.D., Piechan, J.L., Ruble, C.L., Mills, C.J., Schellin, K.A.B., Slightom, J.L., Fitzgerald, L.R., Benjamin, C.W., Roberds, S.L., 2003. A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 319, 137–148. doi:10.1016/S0378-1119(03)00803-5
- Katz, B., Thesleff, S., 1957. A study of the “desensitization” produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138, 63–80. doi:10.1113/jphysiol.1957.sp005838
- Kinde, M.N., Chen, Q., Lawless, M.J., Mowrey, D.D., Xu, J., Saxena, S., Xu, Y.,

- Tang, P., 2015. Conformational Changes Underlying Desensitization of the Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC. *Structure* 23, 995–1004. doi:10.1016/j.str.2015.03.017
- Koshland, D.E., Némethy, G., Filmer, D., 1966. Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5, 365–385. doi:10.1021/bi00865a047
- Kosower, E.M., Kanety, H., Dodiuk, H., Hermolin, J., 1982. Bimanes. 9. Solvent and substituent effects on intramolecular charge-transfer quenching of the fluorescence of syn-1,5-diazabicyclo[3.3.0]octadienediones (syn-9,10-dioxabimanes). *J. Phys. Chem.* 86, 1270–1277. doi:10.1021/j100397a013
- Kosower, E.M., Pazhenchevsky, B., Hershkowitz, E., 1978. 1,5-Diazabicyclo[3.3.0]octadienediones (9,10-dioxabimanes). Strongly fluorescent syn isomers. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 6516–6518. doi:10.1021/ja00488a050
- Kosower, N.S., Kosower, E.M., Newton, G.L., Ranney, H.M., 1979. Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3382–3386.
- Krashia, P., Moroni, M., Broadbent, S., Hofmann, G., Kracun, S., Beato, M., Groot-Kormelink, P.J., Sivilotti, L.G., 2010. Human $\alpha 3\beta 4$ neuronal nicotinic receptors show different stoichiometry if they are expressed in *Xenopus* oocytes or mammalian HEK293 cells. *PLoS One* 5, e13611. doi:10.1371/journal.pone.0013611
- Krishnaswamy, A., Cooper, E., 2012. Reactive oxygen species inactivate neuronal nicotinic acetylcholine receptors through a highly conserved cysteine near the intracellular mouth of the channel: implications for diseases that involve oxidative stress. *J. Physiol.* 590, 39–47. doi:10.1113/jphysiol.2011.214007
- Kudryashev, M., Castaño-Díez, D., Deluz, C., Hassaine, G., Grasso, L., Graf-Meyer, A., Vogel, H., Stahlberg, H., 2016. The Structure of the Mouse Serotonin 5-HT₃ Receptor in Lipid Vesicles. *Structure* 24, 165–170. doi:10.1016/j.str.2015.11.004
- Kuhse, J., Laube, B., Magalei, D., Betz, H., 1993. Assembly of the inhibitory glycine receptor: Identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron* 11, 1049–1056. doi:10.1016/0896-

6273(93)90218-G

- Kullmann, D.M., 2010. Neurological channelopathies. *Annu. Rev. Neurosci.* 33, 151–72. doi:10.1146/annurev-neuro-060909-153122
- Kumar, J., Mayer, M.L., 2013. Functional Insights from Glutamate Receptor Ion Channel Structures*.
- Kwon, O.-H., Ortalan, V., Zewail, A.H., 2011. Macromolecular structural dynamics visualized by pulsed dose control in 4D electron microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 6026–31. doi:10.1073/pnas.1103109108
- Labarca, C., Nowak, M.W., Zhang, H., Tang, L., Deshpande, P., Lester, H.A., 1995. Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature* 376, 514–6. doi:10.1038/376514a0
- Labriola, J.M., Pandhare, A., Jansen, M., Blanton, M.P., Corringer, P.-J., Baenziger, J.E., 2013. Structural Sensitivity of a Prokaryotic Pentameric Ligand-gated Ion Channel to Its Membrane Environment. *J. Biol. Chem.* 288, 11294–11303. doi:10.1074/jbc.M113.458133
- Laha, K.T., Ghosh, B., Czajkowski, C., 2013. Macroscopic Kinetics of Pentameric Ligand Gated Ion Channels: Comparisons between Two Prokaryotic Channels and One Eukaryotic Channel. *PLoS One* 8, e80322. doi:10.1371/journal.pone.0080322
- Langosch, D., Thomas, L., Betz, H., 1988. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 7394–8.
- Lape, R., Colquhoun, D., Sivilotti, L.G., 2008. On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* 454, 722–7. doi:10.1038/nature07139
- Laube, B., Kuhse, J., Rundström, N., Kirsch, J., Schmieden, V., Betz, H., 1995. Modulation by zinc ions of native rat and recombinant human inhibitory glycine receptors. *J. Physiol.* 483, 613–619. doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020610
- Leffler, J.E., 1953. Parameters for the Description of Transition States. *Science* 117, 340–1. doi:10.1126/science.117.3039.340
- Lombardo, S., Maskos, U., 2015. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in

- Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* 96, 255–262. doi:10.1016/j.neuropharm.2014.11.018
- Lummis, S.C.R., 2012. 5-HT(3) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40239–45. doi:10.1074/jbc.R112.406496
- Lynch, J.W., 2009. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56, 303–9. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.034
- Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., Gallagher, M.J., 2010. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J. Physiol.* 588, 1861–9. doi:10.1113/jphysiol.2010.186999
- Mansoor, S.E., Mchaourab, H.S., Farrens, D.L., 2002. Mapping Proximity within Proteins Using Fluorescence Spectroscopy. A Study of T4 Lysozyme Showing That Tryptophan Residues Quench Bimane Fluorescence†. *Biochemistry* 41, 2475–2484. doi:10.1021/bi011198i
- Maricq, A., Peterson, A., Brake, A., Myers, R., Julius, D., 1991. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science (80-.)*. 254, 432–437. doi:10.1126/science.1718042
- Martinez, K.L., Gohon, Y., Corringer, P.-J., Tribet, C., Mérola, F., Changeux, J.-P., Popot, J.-L., 2002. Allosteric transitions of Torpedo acetylcholine receptor in lipids, detergent and amphipols: molecular interactions vs. physical constraints. *FEBS Lett.* 528, 251–256. doi:10.1016/S0014-5793(02)03306-9
- Mascia, M.P., Machu, T.K., Harris, R.A., 1996. Enhancement of homomeric glycine receptor function by longchain alcohols and anaesthetics. *Br. J. Pharmacol.* 119, 1331–1336. doi:10.1111/j.1476-5381.1996.tb16042.x
- McCallum, S.E., Parameswaran, N., Bordia, T., McIntosh, J.M., Grady, S.R., Quik, M., 2005. Decrease in alpha3*/alpha6* nicotinic receptors but not nicotine-evoked dopamine release in monkey brain after nigrostriatal damage. *Mol. Pharmacol.* 68, 737–46. doi:10.1124/mol.105.012773
- Millar, N.S., Gotti, C., 2009. Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56, 237–46. doi:10.1016/j.neuropharm.2008.07.041
- Miller, P.S., Aricescu, A.R., 2014. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512, 270–275. doi:10.1038/nature13293

- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Unwin, N., 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949–955. doi:10.1038/nature01748
- Monod, J., Wyman, J., Changeux, J., 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J. Mol. Biol.* 12, 88–118.
- Monti, J.M., Pandi-Perumal, S.R., Möhler, H. (Eds.), 2010. *GABA and Sleep*. Springer Basel, Basel. doi:10.1007/978-3-0346-0226-6
- Moraga-Cid, G., Sauguet, L., Huon, C., Malherbe, L., Girard-Blanc, C., Petres, S., Murail, S., Taly, A., Baaden, M., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2015. Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on an $\alpha 1$ glycine receptor transmembrane structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 2865–70. doi:10.1073/pnas.1417864112
- Mortensen, M., Smart, T.G., 2007. Single-channel recording of ligand-gated ion channels. *Nat. Protoc.* 2, 2826–41. doi:10.1038/nprot.2007.403
- Mounsey, K.E., Dent, J.A., Holt, D.C., McCarthy, J., Currie, B.J., Walton, S.F., 2007. Molecular characterisation of a pH-gated chloride channel from *Sarcoptes scabiei*. *Invert. Neurosci.* 7, 149–56. doi:10.1007/s10158-007-0050-6
- Mowrey, D., Chen, Q., Liang, Y., Liang, J., Xu, Y., Tang, P., 2013. Signal transduction pathways in the pentameric ligand-gated ion channels. *PLoS One* 8, e64326. doi:10.1371/journal.pone.0064326
- Mowrey, D.D., Cui, T., Jia, Y., Ma, D., Makhov, A.M., Zhang, P., Tang, P., Xu, Y., 2013. Open-channel structures of the human glycine receptor $\alpha 1$ full-length transmembrane domain. *Structure* 21, 1897–904. doi:10.1016/j.str.2013.07.014
- Mukhtasimova, N., Lee, W.Y., Wang, H.-L., Sine, S.M., 2009. Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature* 459, 451–454. doi:10.1038/nature07923
- Muretta, J.M., Rohde, J.A., Johnsrud, D.O., Cornea, S., Thomas, D.D., 2015. Direct real-time detection of the structural and biochemical events in the myosin power stroke. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 14272–7. doi:10.1073/pnas.1514859112
- Muroi, Y., Czajkowski, C., Jackson, M.B., 2006. Local and Global Ligand-Induced Changes in the Structure of the GABA_A Receptor†. *Biochemistry*

45, 7013–7022. doi:10.1021/bi060222v

- Muroi, Y., Theusch, C.M., Czajkowski, C., Jackson, M.B., 2009. Distinct Structural Changes in the GABAA Receptor Elicited by Pentobarbital and GABA. *Biophys. J.* 96, 499–509. doi:10.1016/j.bpj.2008.09.037
- Nakahiro, M., Arakawa, O., Nishimura, T., Narahashi, T., 1996. Potentiation of GABA-induced Cl⁻ current by a series of n-alcohols disappears at a cutoff point of a longer-chain n-alcohol in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci. Lett.* 205, 127–130. doi:10.1016/0304-3940(96)12397-1
- Niesler, B., 2011. 5-HT(3) receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11, 81–6. doi:10.1016/j.coph.2011.01.011
- Niesler, B., Frank, B., Kapeller, J., Rappold, G.A., 2003. Cloning, physical mapping and expression analysis of the human 5-HT3 serotonin receptor-like genes HTR3C, HTR3D and HTR3E. *Gene* 310, 101–111. doi:10.1016/S0378-1119(03)00503-1
- Nury, H., Poitevin, F., Van Renterghem, C., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., Baaden, M., 2010. One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 6275–80. doi:10.1073/pnas.1001832107
- Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J.-P., Sonner, J.M., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2011. X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469, 428–431. doi:10.1038/nature09647
- Oliveira, Á., Illes, P., Ulrich, H., 2015. Purinergic receptors in embryonic and adult neurogenesis. *Neuropharmacology.* doi:10.1016/j.neuropharm.2015.10.008
- Olofsson, L., Felekyan, S., Doumazane, E., Scholler, P., Fabre, L., Zwier, J.M., Rondard, P., Seidel, C.A.M., Pin, J.-P., Margeat, E., 2014. Fine tuning of sub-millisecond conformational dynamics controls metabotropic glutamate receptors agonist efficacy. *Nat. Commun.* 5, 5206. doi:10.1038/ncomms6206
- Ortells, M.O., Lunt, G.G., 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci.* 18, 121–7.
- Oyola-Cintrón, J., Caballero-Rivera, D., Ballester, L., Baéz-Pagán, C.A.,

- Martínez, H.L., Vélez-Arroyo, K.P., Quesada, O., Lasalde-Dominicci, J.A., 2015. Lateral diffusion, function, and expression of the slow channel congenital myasthenia syndrome α C418W nicotinic receptor mutation with changes in lipid raft components. *J. Biol. Chem.* 290, 26790–800. doi:10.1074/jbc.M115.678573
- Pan, J., Chen, Q., Willenbring, D., Yoshida, K., Tillman, T., Kashlan, O.B., Cohen, A., Kong, X.-P., Xu, Y., Tang, P., 2012. Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine. *Nat. Commun.* 3, 714. doi:10.1038/ncomms1703
- Papke, D., Grosman, C., 2014. The role of intracellular linkers in gating and desensitization of human pentameric ligand-gated ion channels. *J. Neurosci.* 34, 7238–52. doi:10.1523/JNEUROSCI.5105-13.2014
- Parikh, R.B., Bali, M., Akabas, M.H., 2011. Structure of the M2 Transmembrane Segment of GLIC, a Prokaryotic Cys Loop Receptor Homologue from *Gloeobacter violaceus*, Probed by Substituted Cysteine Accessibility. *J. Biol. Chem.* 286, 14098 –14109. doi:10.1074/jbc.M111.221895
- Pless, S.A., Dibas, M.I., Lester, H.A., Lynch, J.W., 2007. Conformational Variability of the Glycine Receptor M2 Domain in Response to Activation by Different Agonists. *J. Biol. Chem.* 282, 36057 –36067. doi:10.1074/jbc.M706468200
- Pless, S.A., Lynch, J.W., 2009a. Ligand-specific Conformational Changes in the α 1 Glycine Receptor Ligand-binding Domain. *J. Biol. Chem.* 284, 15847 –15856. doi:10.1074/jbc.M809343200
- Pless, S.A., Lynch, J.W., 2009b. Magnitude of a Conformational Change in the Glycine Receptor β 1- β 2 Loop Is Correlated with Agonist Efficacy. *J. Biol. Chem.* 284, 27370–27376. doi:10.1074/jbc.M109.048405
- Pless, S.A., Lynch, J.W., 2008. Illuminating the Structure and Function of Cys-Loop Receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 35, 1137–1142. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04954.x
- Poon, W.-T., Au, K.-M., Chan, Y.-W., Chan, K.-Y., Chow, C.-B., Tong, S.-F., Lam, C.-W., 2006. Novel missense mutation (Y279S) in the GLRA1 gene causing hyperekplexia. *Clin. Chim. Acta.* 364, 361–2. doi:10.1016/j.cca.2005.09.018
- Prevost, M.S., Delarue-Cochin, S., Marteaux, J., Colas, C., Van Renterghem,

- C., Blondel, A., Malliavin, T., Corringer, P.-J., Joseph, D., 2013a. Identification of cinnamic acid derivatives as novel antagonists of the prokaryotic proton-gated ion channel GLIC. *J. Med. Chem.* 56, 4619–30. doi:10.1021/jm400374q
- Prevost, M.S., Moraga-Cid, G., Van Renterghem, C., Edelstein, S.J., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., 2013b. Intermediate closed state for glycine receptor function revealed by cysteine cross-linking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 17113–8. doi:10.1073/pnas.1317009110
- Prevost, M.S., Sauguet, L., Nury, H., Renterghem, C. Van, Huon, C., Poitevin, F., Baaden, M., Delarue, M., Corringer, P.-J., 2012. A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 642–649. doi:10.1038/nsmb.2307
- Purohit, P., Auerbach, A., 2009. Unliganded gating of acetylcholine receptor channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 115–20. doi:10.1073/pnas.0809272106
- Purohit, P., Auerbach, A., 2007. Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: the “pre-M1” linker. *J. Gen. Physiol.* 130, 559–68. doi:10.1085/jgp.200709857
- Purohit, P., Gupta, S., Jadey, S., Auerbach, A., 2013. Functional anatomy of an allosteric protein. *Nat. Commun.* 4. doi:10.1038/ncomms3984
- Purohit, P., Mitra, A., Auerbach, A., 2007. A stepwise mechanism for acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 446, 930–3. doi:10.1038/nature05721
- Quick, M.W., Lester, R.A.J., 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J. Neurobiol.* 53, 457–78. doi:10.1002/neu.10109
- Quik, M., Bordia, T., Zhang, D., Perez, X.A., 2015. Nicotine and Nicotinic Receptor Drugs: Potential for Parkinson’s Disease and Drug-Induced Movement Disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 124, 247–71. doi:10.1016/bs.irn.2015.07.005
- Rees, M.I., Harvey, K., Ward, H., White, J.H., Evans, L., Duguid, I.C., Hsu, C.C.-H., Coleman, S.L., Miller, J., Baer, K., Waldvogel, H.J., Gibbon, F., Smart, T.G., Owen, M.J., Harvey, R.J., Snell, R.G., 2003. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *J. Biol. Chem.*

278, 24688–96. doi:10.1074/jbc.M301070200

- Rienzo, M., Lummis, S.C.R., Dougherty, D.A., 2014. Structural requirements in the transmembrane domain of GLIC revealed by incorporation of noncanonical histidine analogs. *Chem. Biol.* 21, 1700–6. doi:10.1016/j.chembiol.2014.10.019
- Rienzo, M., Rocchi, A.R., Threatt, S.D., Dougherty, D.A., Lummis, S.C.R., 2016. Perturbation of Critical Prolines in *Gloeobacter violaceus* Ligand-gated Ion Channel (GLIC) Supports Conserved Gating Motions among Cys-loop Receptors. *J. Biol. Chem.* 291, 6272–80. doi:10.1074/jbc.M115.694372
- Rudolph, U., Möhler, H., 2014. GABAA receptor subtypes: Therapeutic potential in Down syndrome, affective disorders, schizophrenia, and autism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 54, 483–507. doi:10.1146/annurev-pharmtox-011613-135947
- Rundström, N., Schmieden, V., Betz, H., Bormann, J., Langosch, D., 1994. Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 8950–4.
- Sanders, R.D., Grover, V., Goulding, J., Godlee, A., Gurney, S., Snelgrove, R., Ma, D., Singh, S., Maze, M., Hussell, T., 2015. Immune cell expression of GABAA receptors and the effects of diazepam on influenza infection. *J. Neuroimmunol.* 282, 97–103. doi:10.1016/j.jneuroim.2015.04.001
- Sauguet, L., Fourati, Z., Prangé, T., Delarue, M., Colloc'h, N., 2016. Structural Basis for Xenon Inhibition in a Cationic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel. *PLoS One* 11, e0149795. doi:10.1371/journal.pone.0149795
- Sauguet, L., Howard, R.J., Malherbe, L., Lee, U.S., Corringer, P.-J., Adron Harris, R., Delarue, M., 2013a. Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nat. Commun.* 4, 1697. doi:10.1038/ncomms2682
- Sauguet, L., Poitevin, F., Murail, S., Van Renterghem, C., Moraga-Cid, G., Malherbe, L., Thompson, A.W., Koehl, P., Corringer, P.-J., Baaden, M., Delarue, M., 2013b. Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 32, 728–41. doi:10.1038/emboj.2013.17
- Sauguet, L., Poitevin, F., Murail, S., Van Renterghem, C., Moraga-Cid, G., Malherbe, L., Thompson, A.W., Koehl, P., Corringer, P.-J., Baaden, M.,

- Delarue, M., 2013c. Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 32, 728–741. doi:10.1038/emboj.2013.17
- Sauguet, L., Shahsavar, A., Delarue, M., 2015. Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochim. Biophys. Acta* 1850, 511–23. doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.007
- Sauguet, L., Shahsavar, A., Poitevin, F., Huon, C., Menny, A., Nemezc, À., Haouz, A., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., 2014. Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 966–71.
- Schmandt, N., Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., Stein, R.A., Bonner, R., Talley, L., Parker, M.D., Mchaourab, H.S., Yee, V.C., Lodowski, D.T., Chakrapani, S., 2015. A chimeric prokaryotic pentameric ligand-gated channel reveals distinct pathways of activation. *J. Gen. Physiol.* 146, 323–40. doi:10.1085/jgp.201511478
- Scimemi, A., Beato, M., 2009. Determining the neurotransmitter concentration profile at active synapses. *Mol. Neurobiol.* 40, 289–306. doi:10.1007/s12035-009-8087-7
- Seifi, M., Brown, J.F., Mills, J., Bhandari, P., Belelli, D., Lambert, J.J., Rudolph, U., Swinny, J.D., 2014. Molecular and functional diversity of GABA-A receptors in the enteric nervous system of the mouse colon. *J. Neurosci.* 34, 10361–78. doi:10.1523/JNEUROSCI.0441-14.2014
- Seljeset, S., Lavery, D., Smart, T.G., 2015. Inhibitory neurosteroids and the GABAA receptor. *Adv. Pharmacol.* 72, 165–87. doi:10.1016/bs.apha.2014.10.006
- Semenova, N.P., Abarca-Heidemann, K., Loranc, E., Rothberg, B.S., 2009. Bimane Fluorescence Scanning Suggests Secondary Structure near the S3-S4 Linker of BK Channels. *J. Biol. Chem.* 284, 10684–10693. doi:10.1074/jbc.M808891200
- Shen, J., Wu, J., 2015. Nicotinic Cholinergic Mechanisms in Alzheimer's Disease. *Int. Rev. Neurobiol.* 124, 275–92. doi:10.1016/bs.irn.2015.08.002
- Shimada, S., Cutting, G., Uhl, G.R., 1992. gamma-Aminobutyric acid A or C receptor? gamma-Aminobutyric acid rho 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive gamma-

- aminobutyric acid responses in *Xenopus* oocytes. *Mol. Pharmacol.* 41, 683–7.
- Shingai, R., Yanagi, K., Fukushima, T., Sakata, K., Ogurusu, T., 1996. Functional expression of GABA ρ 3 receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci. Res.* 26, 387–390. doi:10.1016/S0168-0102(96)01114-5
- Sigel, E., Steinmann, M.E., 2012a. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–31. doi:10.1074/jbc.R112.386664
- Sigel, E., Steinmann, M.E., 2012b. Structure, function, and modulation of GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* 287, 40224–31. doi:10.1074/jbc.R112.386664
- Simon, J., Wakimoto, H., Fujita, N., Lalande, M., Barnard, E.A., 2004. Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J. Biol. Chem.* 279, 41422–35. doi:10.1074/jbc.M401354200
- Sine, S.M., Steinbach, J.H., 1986. Acetylcholine receptor activation by a site-selective ligand: nature of brief open and closed states in BC3H-1 cells. *J. Physiol.* 370, 357–379. doi:10.1113/jphysiol.1986.sp015939
- Sivilotti, L.G., McNeil, D.K., Lewis, T.M., Nassar, M.A., Schoepfer, R., Colquhoun, D., 1997. Recombinant nicotinic receptors, expressed in *Xenopus* oocytes, do not resemble native rat sympathetic ganglion receptors in single-channel behaviour. *J. Physiol.* 500, 123–138. doi:10.1113/jphysiol.1997.sp022004
- Smart, T.G., Paoletti, P., 2012. Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, a009662–. doi:10.1101/cshperspect.a009662
- Smirnova, I., Kasho, V., Kaback, H.R., 2014. Real-time conformational changes in LacY. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 8440–8445. doi:10.1073/pnas.1408374111
- Spurny, R., Billen, B., Howard, R.J., Brams, M., Debaveye, S., Price, K.L., Weston, D.A., Strelkov, S. V., Tytgat, J., Bertrand, S., Bertrand, D., Lummis, S.C.R., Ulens, C., 2013. Multisite binding of a general anesthetic to the prokaryotic pentameric *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel (ELIC). *J. Biol. Chem.* 288, 8355–64. doi:10.1074/jbc.M112.424507
- Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., Verheij,

- M., Legrand, P., Bertrand, D., Bertrand, S., Dougherty, D.A., de Esch, I.J.P., Corringer, P.-J., Sieghart, W., Lummis, S.C.R., Ulens, C., 2012. Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, E3028–34. doi:10.1073/pnas.1208208109
- Steinlein, O.K., 2012. Ion channel mutations in neuronal diseases: a genetics perspective. *Chem. Rev.* 112, 6334–52. doi:10.1021/cr300044d
- Steinlein, O.K., 2004. Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 400–8. doi:10.1038/nrn1388
- Swope, S.L., Moss, S.J., Raymond, L.A., Huganir, R.L., 1999. Regulation of Ligand-Gated Ion Channels by Protein Phosphorylation. *Adv Second Messenger Phosphoprot.* 33, 318.
- Taly, A., Corringer, P.-J., Guedin, D., Lestage, P., Changeux, J.-P., 2009. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat. Rev. Drug Discov.* 8, 733–50. doi:10.1038/nrd2927
- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P., 2005a. Normal Mode Analysis Suggests a Quaternary Twist Model for the Nicotinic Receptor Gating Mechanism. *Biophys. J.* 88, 3954–3965. doi:10.1529/biophysj.104.050229
- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P.-J., Changeux, J.-P., 2005b. Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophys. J.* 88, 3954–65. doi:10.1529/biophysj.104.050229
- Taraska, J.W., Puljung, M.C., Olivier, N.B., Flynn, G.E., Zagotta, W.N., 2009a. Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET. *Nat. Methods* 6, 532–537. doi:10.1038/nmeth.1341
- Taraska, J.W., Puljung, M.C., Zagotta, W.N., 2009b. Short-distance probes for protein backbone structure based on energy transfer between bimane and transition metal ions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 16227–16232. doi:10.1073/pnas.0905207106
- Taraska, J.W., Zagotta, W.N., 2010. Fluorescence Applications in Molecular Neurobiology. *Neuron* 66, 170–189. doi:10.1016/j.neuron.2010.02.002
- Taraska, J.W., Zagotta, W.N., 2007. Structural dynamics in the gating ring of

- cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 854–60. doi:10.1038/nsmb1281
- Tasneem, A., Iyer, L.M., Jakobsson, E., Aravind, L., 2005. Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol.* 6, R4. doi:10.1186/gb-2004-6-1-r4
- Tewari, M., Seth, P., 2015. Emerging role of P2X7 receptors in CNS health and disease. *Ageing Res. Rev.* 24, 328–42. doi:10.1016/j.arr.2015.10.001
- Trattinig, S.M., Gasiorek, A., Deeb, T.Z., Ortiz, E.J.C., Moss, S.J., Jensen, A.A., Davies, P.A., 2016. Copper and protons directly activate the zinc-activated channel. *Biochem. Pharmacol.* 103, 109–117. doi:10.1016/j.bcp.2016.02.004
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., Dingledine, R., 2010. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol. Rev.* 62, 405–96. doi:10.1124/pr.109.002451
- Ulens, C., Spurny, R., Thompson, A.J., Alqazzaz, M., Debaveye, S., Han, L., Price, K., Villalgorido, J.M., Tresadern, G., Lynch, J.W., Lummis, S.C.R., 2014. The prokaryote ligand-gated ion channel ELIC captured in a pore blocker-bound conformation by the Alzheimer's disease drug memantine. *Structure* 22, 1399–407. doi:10.1016/j.str.2014.07.013
- Unwin, N., 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346, 967–989. doi:10.1016/j.jmb.2004.12.031
- Varnäs, K., Halldin, C., Hall, H., 2004. Autoradiographic distribution of serotonin transporters and receptor subtypes in human brain. *Hum. Brain Mapp.* 22, 246–60. doi:10.1002/hbm.20035
- Velisetty, P., Chakrapani, S., 2012a. Desensitization Mechanism in Prokaryotic Ligand-Gated Ion Channel. *J. Biol. Chem.* 287, 18467–18477. doi:10.1074/jbc.M112.348045
- Velisetty, P., Chakrapani, S., 2012b. Desensitization Mechanism in Prokaryotic Ligand-gated Ion Channel. *J. Biol. Chem.* 287, 18467–18477. doi:10.1074/jbc.M112.348045
- Velisetty, P., Chakrapani, S., 2012c. Desensitization mechanism in prokaryotic ligand-gated ion channel. *J. Biol. Chem.* 287, 18467–18477.

doi:10.1074/jbc.M112.348045

- Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., Chakrapani, S., 2014. Structural Basis for Allosteric Coupling at the Membrane-Protein Interface in *Gloeobacter violaceus* Ligand-gated Ion Channel (GLIC). *J. Biol. Chem.* 289, 3013–3025. doi:10.1074/jbc.M113.523050
- Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., Chakrapani, S., 2012a. Conformational Transitions Underlying Pore Opening and Desensitization in Membrane-embedded *Gloeobacter violaceus* Ligand-gated Ion Channel (GLIC). *J. Biol. Chem.* 287, 36864–36872. doi:10.1074/jbc.M112.401067
- Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., Chakrapani, S., 2012b. Conformational Transitions Underlying Pore Opening and Desensitization in Membrane-embedded *Gloeobacter violaceus* Ligand-gated Ion Channel (GLIC). *J. Biol. Chem.* 287, 36864–36872. doi:10.1074/jbc.M112.401067
- Wallace, T.L., Bertrand, D., 2015. Neuronal $\alpha 7$ Nicotinic Receptors as a Target for the Treatment of Schizophrenia. *Int. Rev. Neurobiol.* 124, 79–111. doi:10.1016/bs.irn.2015.08.003
- Walstab, J., Rappold, G., Niesler, B., 2010. 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs. *Pharmacol. Ther.* 128, 146–69. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.07.001
- Wang, D., Jacobs, S.A., Tsien, J.Z., 2014. Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for treating or preventing age-related memory decline. *Expert Opin. Ther. Targets* 18, 1121–30. doi:10.1517/14728222.2014.941286
- Wang, H.-L., Cheng, X., Sine, S.M., 2012. Intramembrane proton binding site linked to activation of bacterial pentameric ion channel. *J. Biol. Chem.* 287, 6482–9. doi:10.1074/jbc.M111.305839
- Wang, L., Almeida, L.E.F., Spornick, N.A., Kenyon, N., Kamimura, S., Khaibullina, A., Nourai, M., Quezado, Z.M.N., 2015. Modulation of social deficits and repetitive behaviors in a mouse model of autism: the role of the nicotinic cholinergic system. *Psychopharmacology (Berl)*. 232, 4303–16. doi:10.1007/s00213-015-4058-z
- Wang, Q., Lynch, J.W., 2011a. Activation and Desensitization Induce Distinct Conformational Changes at the Extracellular-Transmembrane Domain Interface of the Glycine Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 38814 –38824.

doi:10.1074/jbc.M111.273631

- Wang, Q., Lynch, J.W., 2011b. Activation and Desensitization Induce Distinct Conformational Changes at the Extracellular-Transmembrane Domain Interface of the Glycine Receptor. *J. Biol. Chem.* 286, 38814–38824. doi:10.1074/jbc.M111.273631
- Weng, Y., Yang, L., Corringier, P.-J., Sonner, J.M., 2010. Anesthetic sensitivity of the *Gloeobacter violaceus* proton-gated ion channel. *Anesth. Analg.* 110, 59–63. doi:10.1213/ANE.0b013e3181c4bc69
- Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V.R.P., Swaminath, G., Farrens, D., Kobilka, B., 2006. Coupling ligand structure to specific conformational switches in the β 2-adrenoceptor. *Nat Chem Biol* 2, 417–422. doi:10.1038/nchembio801
- Young, G.T., Zwart, R., Walker, A.S., Sher, E., Millar, N.S., 2008. Potentiation of α 7 nicotinic acetylcholine receptors via an allosteric transmembrane site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14686–91. doi:10.1073/pnas.0804372105
- Zdanowski, R., Krzyżowska, M., Ujazdowska, D., Lewicka, A., Lewicki, S., 2015. Role of α 7 nicotinic receptor in the immune system and intracellular signaling pathways. *Cent. J. Immunol. / Polish Soc. Immunol. Elev. other Cent. Immunol. Soc.* 40, 373–9. doi:10.5114/ceji.2015.54602
- Zheng, Y., Hirschberg, B., Yuan, J., Wang, A.P., Hunt, D.C., Ludmerer, S.W., Schmatz, D.M., Cully, D.F., 2002. Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *J. Biol. Chem.* 277, 2000–5. doi:10.1074/jbc.M107635200
- Zimmermann, I., Dutzler, R., 2011. Ligand Activation of the Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC. *PLoS Biol* 9, e1001101. doi:10.1371/journal.pbio.1001101
- Zimmermann, I., Marabelli, A., Bertozzi, C., Sivilotti, L.G., Dutzler, R., 2012. Inhibition of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC by divalent cations. *PLoS Biol.* 10, e1001429. doi:10.1371/journal.pbio.1001429

VI. Annexes

Article 1

« Identification of a fast pre-active conformation of a pentameric channel receptor »

Anaïs Menny, Solène N Lefebvre, Emmanuelle Drège, Zeineb Fourati, Marc Delarue, Stuart J Edelstein, Delphine Joseph, Pierre-Jean Corringer

1 Identification of a fast pre-active conformation of a pentameric channel receptor

2
3 Anaïs Menny^{1,2,3}, Solène N Lefebvre^{1,2,3}, Emmanuelle Drège⁴, Zeineb Fourati^{5,6}, Marc
4 Delarue^{5,6}, Stuart J Edelstein⁷, Delphine Joseph⁴, Pierre-Jean Corringer^{1,2*}

5
6 *: Correspondence should be addressed at pjcorrin@pasteur.

7
8 1 : Channel Receptors Unit, Institut Pasteur, Paris, France. 2 : Centre National de la Recherche Scientifique,
9 Unité Mixte de Recherche 3571, Paris, France. 3 : Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur, Paris,
10 France. 4 : BioCIS, Université Paris-Sud, CNRS, Université Paris Saclay, Châtenay-Malabry, France. 5 : Unité
11 de Dynamique Structurale des Macromolécules, Institut Pasteur, Paris, France. 6 : Centre National de la
12 Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 3528, Paris, France. 7 : Biologie Cellulaire de la Synapse,
13 Inserm U1024, CNRS 8197, Institute of Biology, Ecole Normale Supérieure (ENS), Paris, France.

14 15 **Abstract**

16 Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) mediate fast chemical signalling through
17 global allosteric transitions. Despite the existence of several high-resolution structures of
18 pLGICs, their dynamical properties remain elusive. Using the proton-gated channel GLIC, we
19 engineered multiple fluorescent reporters, each incorporating a bimane and a
20 tryptophan/tyrosine, whose close contact causes fluorescence quenching. We show that proton
21 application causes a global compaction of the extracellular subunit interface, coupled to an
22 outward motion of the M2-M3 loop near the channel gate, and that these movements are
23 highly conserved in lipid vesicles and detergent micelles. Real-time recordings show that
24 most structural reorganizations are completed within 2ms, much faster than channel opening.
25 Our work thus identifies and structurally characterizes a new pre-active intermediate state in
26 the transition pathway towards activation. It provides a template to investigate the gating of
27 eukaryotic neurotransmitter receptors, for which intermediate states also participate in
28 activation.

29
30 Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) mediate fast chemical signalling between
31 cells. Prominent members of the family include nicotinic acetylcholine (nAChRs), 5-HT₃,
32 glycine and GABA_A receptors that are widely expressed in the nervous system. Their
33 mutations cause congenital myasthenia, epilepsy, hyperekplexia, and possibly autistic and
34 schizophrenic syndromes¹. They are the target of major classes of therapeutic substances,
35 including anxiolytics and sedatives, general anaesthetics, smoking cessation drugs, and

1 antiemetics². Hence, understanding the molecular mechanisms underlying their chemo-
2 electric conversion is currently the matter of intensive work.

3 Electrophysiological and biochemical experiments have shown that they exist in three major
4 allosteric states: Resting (closed and activable), Active (open) and Desensitized (closed and
5 refractory to activation)³. In addition to these states, ensemble and single-channel kinetic
6 analyses identified short-lived intermediate states during activation^{4,5}, as well as fast and slow
7 desensitized states⁶.

8

9 The first X-ray structures of full-length pLGICs were obtained on bacterial homologs from
10 *Erwinia chrysanthemi* (ELIC)⁷ and *Gloeobacter violaceus* (GLIC)⁸⁻¹⁰, followed by those of
11 eukaryotic members: the GluCl α R^{11,12}, the β 3GABA α R¹³, the 5-HT₃R¹⁴, the α_3 GlyR¹⁵ by
12 crystallography, and the α 1GlyR¹⁶ by electron microscopy, showing a highly conserved fold
13 from bacteria to mammals. pLGICs are composed of five identical or homologous subunits
14 arranged pseudosymmetrically around a central ion-conducting channel. They bind
15 neurotransmitters within their extracellular domain (ECD), promoting remote opening of an
16 intrinsic ion channel within their transmembrane domain (TMD). Each subunit's ECD is
17 composed of a rigid β -sandwich. The orthosteric binding sites for neurotransmitters are
18 located at the subunit interface, halfway between the membrane and the top of the ECD, and
19 are capped with the loop C. Each subunit's TMD is composed of four membrane-spanning α -
20 helices named M1-4. M2 lines the ion channel, its upper part contributing to the gate that
21 shuts the pore in the closed conformation. The well-conserved loop 2, loop 7 and M2-M3 are
22 found at the ECD-TMD interface. Among these receptors, GLIC^{8,10,17}, GluCl α ^{11,12} and
23 α 1GlyR¹⁶ were each solved in three different conformations showing multiple tertiary and
24 quaternary conformations that remain difficult to assign to a particular physiological state.
25 Notably, all the structures were solved on detergent-solubilized proteins, most of them
26 constrained in a crystal lattice that appears, in several cases, to be favouring a particular
27 conformation regardless of the nature of bound ligands^{18,19}. To bridge the gap between 3D
28 structures and physiological states, complementary methods are thus required to study lipid-
29 inserted, unconstrained receptors, in a time-resolved manner.

30 Here, we used the proton-gated ion channel GLIC²⁰, which was crystallized in three
31 conformations and studied by molecular dynamics and normal mode analysis^{10,21}. We used
32 the tryptophan-induced (TrIQ)^{22,23,24} and tyrosine-induced quenching (TyrIQ)^{25,26} methods to
33 study short-range (5–15 Å) inter-residues, pH-elicited motions of GLIC. The methods consist
34 of covalently linking the protein with the bimane fluorophore, a pH insensitive dye of small

1 size (Fig. 1a), together with the insertion of a tryptophan or a tyrosine residue that quenches
2 the fluorophore when the inter-residue C α -C α distances are less than approximately 15 Å and
3 10 Å, respectively. Previous fluorescence-based studies on pLGICs have used large
4 fluorophores to follow conformational changes²⁷, but the TriQ method has the unique
5 advantage of allowing the direct assignment of fluorescence changes to specific protein
6 motions²⁸.

7

8 **Results**

9 We focused our analysis on the regions known to contribute critically to the gating pathway
10 of pLGICs and that were solvent-accessible. A bimane was introduced at: 1) the subunit
11 interface at the top (D136 and V135) and the middle (R133, at the level of the orthosteric site)
12 of the ECD, to follow quaternary reorganizations; and 2) at both sides of the ECD-TMD
13 interface, at the bottom (K33) of the ECD, on the M2-M3 loop (P250) and at the top of pore-
14 lining M2 α -helix (E243 which is nearby the channel gate residues Ile 233 and Ile 240) to
15 further characterize conformational changes (Fig. 1b).

16

17 **ECD: Analysis of bimane-quencher pairs in DDM micelles**

18 We first studied detergent (dodecylmaltoside)-solubilized GLIC mutants purified from *E. coli*
19 membranes. For each position, a cysteine was engineered in the GLIC Cys-less background
20 (C27S), which does not produce functional alterations (Fig. 4), followed by bimane labeling.
21 The fluorescence intensity, recorded under steady state conditions, was measured at the
22 emission peak (excitation at 385 nm) and was normalized to the intensity under denaturing
23 (1% SDS) conditions.

24 When the bimane is introduced at positions 133 or 136 (termed mBBr133 and mBBr136), the
25 fluorescence shows little variations in the pH 7-pH 3 range, indicating a weak impact of
26 putative surrounding quenchers (Fig. 2a,c). To generate quaternary quenching pairs, we
27 introduced tryptophan residues on the adjacent subunit β -sandwich (Fig. 1b). For mutant
28 mBBr133, the introduction of W23, W44 and W101 has little impact on the fluorescence at
29 all pHs suggesting that these positions are never at quenching distances with the bimane (Fig.
30 2a). For mutant mBBr136, the introduction of W93 produces a strong fluorescence decrease
31 at all pHs indicating in this case that this residue is always within quenching distance with the
32 bimane (Fig. 2c). In contrast, both the mBBr133-W103 and mBBr136-W101 show a marked
33 dose-dependent fluorescence decrease, from 1.3 at pH 7 to 0.7 at pH 4 and 0.7 at pH 7 to 0.3
34 at pH 4, respectively (Fig. 2a,c).

1 These data show that positions 133/103 and positions 136/101 come closer upon acidification
2 of the receptors. At these positions, the bimane and tryptophans were introduced on the rigid
3 loop B from one side of the interface and the rigid β -sandwich from the other side (Fig. 1b).
4 Thus, the fluorescence changes likely reflect a quaternary motion of the ECDs, where the β -
5 sandwiches come closer to one another. Interestingly, a similar movement can be inferred
6 from GLIC X-ray structures. Indeed, GLIC was solved by crystallography at a low proton
7 concentration in a closed-channel conformation (pH 7)¹⁰ and at a high proton concentration in
8 an apparently open-channel conformation (pH 4)^{8,9}. GLIC_{pH7} is characterized by an extended
9 conformation of the ECD, where the subunit β -sandwiches are weakly packed together,
10 whereas GLIC_{pH4} shows a more compact quaternary arrangement of the ECD β -sandwiches.
11 This difference causes decreases of the C β 133/C β 103 (from 9.5 to 8.5 Å) and C β 136/C β 101
12 (from 13 to 9.5 Å) distances, for GLIC_{pH7} and GLIC_{pH4}, respectively, which parallel the
13 fluorescence data.

14 When the bimane is introduced at position mBBr135, the fluorescence dose-response curve
15 shows an inverted bell-shape, starting at 0.7, decreasing down to 0.3 at pH 5-4, then
16 increasing up to 0.6 at pH 3 (Fig. 2b). The GLIC structures show the presence, on the same
17 subunit, of a nearby W72 that appears as a likely endogenous quencher (Fig. 1b). W72 is a
18 canonical residue fully conserved in all pLGICs². To avoid severe mutation-induced structural
19 alteration of GLIC that would result from W72F, we solved the X-ray structure of mBBr135
20 GLIC at pH 4 at 2.6 Å resolution (Fig. 1c and Supplementary Table 6). The structure shows a
21 protein conformation quasi-identical to the wild-type GLIC_{pH4} structure (RMSD=0.26Å), with
22 an additional electron density around the cysteine 135 allowing unambiguous construction of
23 a bimane moiety in 2 out of the 5 subunits. The data indeed show that bimane is at a minimal
24 3.2 Å distance with the indole ring of W72 that is therefore most likely the major partner in
25 the pH-elicited fluorescence changes of mBBr135 (Fig. 1c). As the 135 side chain projects at
26 the subunit interface, the quenching of mBBr135 by W72 seen up to pH 4 also suggests a
27 contraction of the domains interface, driving the bimane moiety toward W72, although at very
28 low pH, the bimane appears to move away from the W72, a movement not seen in the X-ray
29 structures.

30 Finally, we investigated a local tertiary motion of the orthosteric site, by combining the
31 mBBr136 mutation with the introduction of a tryptophan at position 178 at the tip of the loop
32 C from the same subunit (Fig. 1b). W178 leads to a 50% decrease in fluorescence at all pH
33 tested, indicating that both positions are at quenching distance, but that their relative distance
34 is unchanged upon proton application (Fig. 2c). It is noteworthy that loop C has been

1 proposed to undergo a “capping” motion during activation of pLGICs, a feature seen in the
2 GLIC X-ray structures where loop C is detached from the subunit β -sandwich at pH 7
3 ($C\beta_{136}$ - $C\beta_{178}$ = 14 Å), and is closer at pH 4 ($C\beta_{136}$ - $C\beta_{178}$ = 10.5 Å). Thus, in contrast to
4 X-ray structures, fluorescence data on a freely moving protein suggest that loop C always
5 adopts a “capped” conformation on the ECD.

6

7 **ECD/TMD interface: Analysis of bimane-quencher pairs in DDM micelles**

8 First, we introduced a bimane at the tip of loop 2 from the ECD (mBBr33), which lies on top
9 of the M2 helix (Fig. 1b). mBBr33 shows a marked dose-dependent decrease in fluorescence
10 from 0.8 to 0.4 from pH 7 to pH 4 (Fig. 2d). The single putative quencher neighbouring
11 mBBr33, W160, is located on the adjacent subunit at the bottom of the outer beta sandwich
12 (Fig. 1b). Its mutation (W160F) essentially abolishes the proton-elicited fluorescent decrease,
13 with a 20% only decreased intensity at pH 6, followed by a return to pH 7-like values at lower
14 pHs, showing that mBBr33 and W160 come closer together in presence of agonist. In the
15 structures of GLIC, both positions also appear to come closer as their $C\beta$ - $C\beta$ distances vary
16 from 17 to 14.6 Å from pH 7 to pH 4.

17 Second, we introduced a bimane at position 250 within the M2-M3 loop (Fig. 1b). mBBr250
18 shows, at pH 7, a peak intensity of 0.6, followed by a dose-dependent increase in intensity, up
19 to 0.8 at pH 3 (Fig. 2f). The effect of three surrounding tyrosines and a single tryptophan were
20 investigated through mutation to phenylalanine (Fig. 1b). Mutants mBBr250-W160F and -
21 Y194F both lead to a modest increase in fluorescence at all pHs suggesting that they remain at
22 similar quenching distances with the mBBr independently of the protein conformation (Fig.
23 2f). In contrast, Y197F and Y251F reduce the fluorescence quenching at high pHs, yielding a
24 flat dose-dependant curve. Since the mutant mBBr250-Y251F is non-functional, it is difficult
25 to draw conclusions about its role in the lack of fluorescence variations, unlike the mutant
26 mBBr-Y197F which shows that positions 250 and 197 move away from each other in
27 presence of agonist (Fig. 2f). Interestingly, the $GLIC_{pH7}$ and $GLIC_{pH4}$ structures show a nearly
28 constant $C\beta$ - $C\beta$ distance for the 250-160 and 250-194 pairs, while the $C\beta_{250}$ - $C\beta_{197}$ distance
29 moves from 8 to 11 Å upon pH decrease. In $GLIC_{pH4}$, the separation of positions 250 and 197
30 is caused by a rigid body outward motion of the M2-M3 loop, which detaches from the top of
31 M1, and is concerted with a tilt of the top of M2 and the opening of the gate of the channel.
32 Thus, the separation of positions 250 and 197 measured by fluorescence parallels the key
33 outward motion of the M2-M3 loop proposed from the static X-ray structures^{8,10}.

1 Third, we introduced a bimane on the top of the M2 α -helices (mBBr243) less than one
2 helical-turn away from the channel-gate residue Ile240 (Fig. 1b). mBBr243 shows a marked
3 blue shift (10 nm) and a fluorescence 1.6 times higher than the denatured protein at pH 7
4 indicating a confined/hydrophobic environment of the probe (Fig. 2e and Supplementary Fig.
5 1b). Upon acidification, the fluorescence decreases to 1.1 at pH 4 and increases to 1.4 at pH 3,
6 pointing to complex reorganizations. Since E243 is at a key position, we introduced
7 tryptophan residues around the probe to engineer new dose-dependent quenching pairs (Fig.
8 1b). W33 on loop 2, W201 on M1, W242 and especially W241 on M2, all produce robust
9 fluorescent quenching at pH 7 but failed to elicit dose-dependant fluorescent variation, except
10 mBBr243-W33, which shows a slight increase at very low pH (Fig. 2e). This suggests that
11 the bimane fused bis-heterocycle points toward the helix bundle of the adjacent subunit. In
12 contrast, the mutant mBBr243-W201 shows a marked pH-dependant decrease from a
13 fluorescence intensity of 1 at pH 7 to 0.2 at pH 4, suggesting that these positions move closer
14 to each other upon acidification of the receptor (Fig. 2e). Interestingly, the X-ray structures
15 suggest that the opening of the channel gate is caused by a tilt of the M2 helices, which move
16 closer to M1 and the 243C β -201C β distances narrows down from 14 Å at pH 7 to 8.9 Å at pH
17 4. Marked changes in distances are also observed between positions 243 and 33, 241 and 243,
18 but with C β -C β distances always lower than 12 Å. These observations are in agreement with
19 the important fluorescence decrease measured on the receptors, suggesting that the
20 corresponding tryptophans always remain at quenching distances with the bimane.

21 Altogether, the Trp/TyrIQ analysis generates a series of fluorescent reporters that cover key
22 regions in the gating mechanism. At the top (135-72 and 136-101), the middle (133-103) and
23 the bottom (33-160) of the ECD, four bimane-quencher pairs show that both sides of the
24 interface between subunits move closer together, pointing to the overall contraction of the
25 ECD. At TMD, the 250-197 pair follows a separation of the M2-M3 loop from the top of M1
26 of the adjacent subunit as an outward motion of the loop, and the 243-201 pair on the M2
27 helix shows a movement towards the M1 helix, while mBBr243 alone shows a more complex,
28 structurally unassigned reorganization of the TMD helix bundle.

29 It is noteworthy that these motions, with the exception of the immobility of loop C, are in the
30 same direction as those deduced from the comparison of the GLIC_{pH7} and GLIC_{pH4} structures.
31 Therefore, similar reorganizations are observed for DDM-solubilized GLIC in and out of the
32 crystal, although the extent of these motions might differ in amplitude. Interestingly, available
33 structures of the GluCl α R^{11,12} and the α 1GlyR¹⁶ also suggest an unblooming motion of the

1 ECD upon agonist binding, as well as outward motions of the M2-M3 loop upon channel
2 opening that are similar to that observed on GLIC.

3 To link these motions to the gating transition of the receptor, we further studied GLIC in lipid
4 bilayers, performing both steady-state and real-time fluorescence measurements as well as
5 electrophysiological recordings.

6

7 **Detergent-solubilized and lipid-reconstituted GLIC show similar pH-elicited**
8 **reorganizations.**

9 To examine the impact of the membrane environment on the receptor reorganizations, we
10 reconstituted selected mBBR-GLIC mutants in asolectin liposomes, which are a mixture of
11 lipids that were successfully used to reconstitute GLIC in a functional state^{29,30}.

12 Strikingly, at the top and middle of the ECD (mBBR133 +/- W103, mBBR135 and mBBR136
13 +/- W101), steady-state fluorescence absolute values and relative variations are extremely
14 similar in detergent micelles and liposomes (Fig. 3a,b,c and Supplementary Table 1),
15 indicating that the corresponding movements are independent of the membrane environment.

16 At the ECD-TMD interface, liposome reconstitution causes a significant increase in
17 fluorescence of mBBR33 and mBBR250-Y197F mutants at pH 8/7, as compared to detergent
18 conditions (30% and 50% respectively) (Supplementary Table 1). To better visualize the pH-
19 dependent changes, the data were normalized to the pH8/7 values, showing that the marked
20 pH-dependent changes of mBBR250 and mBBR33 are conserved in lipids, although mBBR33-
21 W160F is significantly brighter in detergent. Additionally, both mBBR243 and mBBR243-
22 W201 show similar pH-dependent decreases in fluorescence in detergent and lipid (Fig.
23 3d,e,f). The data thus show that the relative movements at positions 33-160, 250-197 and 243-
24 201 are also essentially conserved in lipids. The difference in fluorescence intensity of certain
25 positions between detergent and lipids cannot be assigned to a particular molecular feature,
26 but are in line with their proximity to the membrane. Indeed, the GLIC_{pH4} structure shows the
27 presence of a bundle of detergent within the pore and of a bound lipid in the upper part of the
28 TMD⁸. These bound molecules could contribute to the differences in microenvironment
29 observed here.

30 It is noteworthy that, contrary to GLIC, most pLGICs are highly sensitive to the membrane
31 environment. For instance, CHAPS-solubilized muscle nAChRs are strongly stabilized in a
32 high-affinity desensitized conformation³¹ and their reconstitution in the absence of anionic
33 lipids or cholesterol (PC liposomes) yields an “uncoupled” conformation that binds agonist
34 with resting state-like low affinity, but does not undergo agonist-evoked conformational

1 transitions³². GLIC does not exhibit the same propensity to adopt an uncoupled conformation
2 and, contrary to ELIC, retains the ability to undergo agonist-elicited conformational change
3 and to activate in PC liposomes and other lipid mixtures^{29,30,33}. A cluster of Trp residues,
4 strengthening M4 interactions with M1/M3, was found to critically contribute to this
5 robustness of GLIC function in various lipid environments^{34,35}. Our data show similar pH-
6 elicited movements in detergent and liposomes, suggesting that this robustness also applies to
7 detergent-solubilized GLIC, at least at the level of the gating pathway herein investigated.

9 **Electrophysiological characterization of the bimane-labeled mutants.**

10 To characterize the bimane-labeled mutants by electrophysiology, we developed a labeling
11 procedure in *Xenopus* oocytes. We found that mBBr does not efficiently label surface
12 receptors, since the reporter mutant GLIC Q193C, which is fully inhibited by reaction with
13 methyl-methanethiosulfate MMTS (Supplementary Fig. 2a), is unaffected nor protected from
14 MMTS inhibition by mBBr treatment. Control experiments on Chinese Hamster Ovary
15 (CHO) cells expressing GLIC-D136C show no surface labeling, but clear accumulation of the
16 fluorophore in the cytoplasm (Supplementary Fig. 2c). To decrease the hydrophobicity of the
17 reagent, we synthesized the bimane-derived Bunte salt (BBs), introducing a negatively
18 charged SO_3^- leaving group (Fig. 1a). After reaction with cysteine residues, the mBBr and
19 BBs yield almost the same coupling product, with similar fluorescence and side-chain volume
20 (Fig. 1a). GLIC-expressing CHO cells show weak entry of the BBs in the cytoplasm and
21 strong labeling at the membrane (Supplementary Fig. 2c). Accordingly, BBs labeling of
22 Q193C-expressing oocytes led to a severe loss of function indicating an efficient reaction
23 with the surface receptors (Supplementary Fig. 2b).

24 Most mutants investigated herein were functional, generating robust pH-elicited currents, with
25 the exception of P250C-W160F -Y251F, E243C-K33W -I201W -V242W (Supplementary
26 Table 2). Among them, P250C-Y251F, E243C-K33W and -V242W display no pH-elicited
27 fluorescent changes, possibly due to the inability of the protein to undergo allosteric
28 transitions.

29 For all functional mutants, dose response curves were measured and currents showed
30 characteristic GLIC activation kinetics, with a slow rise time followed by a plateau that is
31 reached in approximately 30 s, with rare exceptions (Fig. 4 and Supplementary Fig. 4). Most
32 cysteine mutants before BBs labeling show no significant difference in the pH_{50} for activation
33 as compared to wild-type GLIC, with the exception of K33C-W160F that requires higher
34 proton concentration for activation (ΔpH_{50} of 0.76). ΔpH_{50} of less than 0.5 are measured

1 before and after BBs reaction, with the exception of E243C-Trp mutants, showing that the
2 labeling with the small BBs probe weakly affects the gating in most cases (Fig. 4 and
3 Supplementary Table 2).

4 Comparison of the dose-response curves of fluorescence in liposomes (ΔF curves) and
5 electrophysiology (ΔI curves) shows that the fluorescence changes are observed in the same
6 pH-range as channel opening (Supplementary Fig. 3). Yet, for most positions, ΔF curves are
7 significantly shifted to lower proton concentration than ΔI curves. In addition, liposome-
8 reconstituted GLIC was reported to activate at higher proton concentration than cell-
9 expressed GLIC³⁰. While it is difficult to compare dose-dependent effects in liposomes and
10 oocytes, our data suggest that the fluorescence changes, and thus the corresponding structural
11 reorganisations, particularly at positions mBBr135 and mBBr250, may be triggered by proton
12 concentrations lower than those required to open the channel.

13 Altogether, the majority of mutants retain the ligand-gated ion channel function, suggesting
14 that the pH-elicited movements monitored by fluorescence are part of the activation
15 mechanism, although the difference in sensitivity of the ΔF and ΔI curves suggests that these
16 motions might not be fully concerted. In line with this idea, the non-functional P250C-W160F
17 and E243-I201W mutants display robust pH-elicited fluorescence variations, showing that the
18 corresponding motions, namely the separation of the M2-M3 loop from the top of M1, and the
19 top of M1 and the top of M2 moving closer, are not concerted with channel opening in these
20 particular mutants.

21

22 **Rapid kinetic analyses of selected pairs by stopped-flow.**

23 We analysed the time-course of the conformational motions using a stopped-flow apparatus.
24 mBBr-labeled GLIC mutants reconstituted in liposomes were mixed with acidic solutions
25 buffering the proton concentration to a final pH values of 8, 6, 5 and 4, and followed by
26 fluorescence. In all cases, the signal recorded 30 s after mixing was in the same range as in
27 steady state conditions (Supplementary Table 3).

28 Strikingly, for most positions, the changes in fluorescence are found to mainly occur in the
29 dead time of the apparatus, during the first 2 ms of solution mixing (Fig. 5a). While this very
30 fast component is not resolved here, completion of the fluorescence variations in 2 ms
31 indicates an upper value of the time constant below 1 ms. The subsequent variations of
32 fluorescence were subjected to multi-exponential fits, excluding the first 3ms of recording
33 that show high variability (see methods). The binning analysis of all multi-exponentials
34 allows the separation of kinetic values in three phases with time constants ranging from 5-24

1 ms (fast), to 24-385 ms (intermediate) and 385 ms-30 s (slow) (Fig. 5b and Supplementary
2 Table 4). At positions 133, 136, 33 and 250, the dead-time 2 ms “very fast” component,
3 evaluated at the start of the multi-exponential fit at 5 ms, accounts for the majority of the
4 fluorescence variation, especially at pH 4 where 72% to 90% of the fluorescent changes are
5 completed (Fig. 5c and Supplementary Table 4). Therefore, the motion of positions 136-101,
6 133-103 and 33-160 moving closer together, and the separation of 250-197 occur with very
7 fast kinetics.

8 Interestingly, mBBr243 shows a distinctive kinetic pattern, as its first visible fast component
9 of fluorescence decrease accounts for only 30% of the fluorescence variation (Supplementary
10 Table 4). This is followed by an increase in fluorescence accounting for 20% of the
11 fluorescence variation with a time constant of 150 ms. Two other positions, mBBr135 and
12 mBBr33, show fluorescence variations within the same time range, but the associated ΔF
13 values only account for small fractions of the overall fluorescence change (8% and 3%
14 respectively) (Fig. 4c). Although the fluorescence changes at position 243 could not be
15 assigned to particular conformational motions, these data suggest that the upper part of the
16 channel moves in two major steps.

17 Finally, at all positions, slow components of fluorescence variations were recorded with time
18 constants ranging from 285 ms to 30 s and relative ΔF values of no more than 10% of the
19 overall signal, with the exception of mBBr250 (20%) (Fig. 5c and Supplementary Table 4).
20 Positions V135 at the top of the ECD, P250 on the M2-M3 loop, and E243 on the top of the
21 M2 α -helix show the highest fluorescence variations, suggesting the whole protein follows the
22 previously characterized conformational changes, although with minor amplitudes, under
23 prolonged applications of agonist.

24

25 **Discussion**

26

27 The Trp/Tyr IQ method allows monitoring of conformational changes in real time²⁸ and
28 correlations with the electrophysiological responses. In whole cell recordings, GLIC shows a
29 characteristic slow onset of the pH-elicited currents, followed by slower desensitization
30 processes upon prolonged proton exposure, below pH 5^{36,37}. In HEK cells, out-side-out patch
31 clamp recordings under fast perfusion, at pH 4, reveal activation time constants (τ) ranging
32 from 30 to 150 ms. Desensitization was found to be biphasic, with a fast component observed
33 on half of the patches (τ around 200 ms), followed by a slow component observed in all
34 patches (τ around 10 s)³⁸. For GLIC reconstituted in asolectin liposomes recorded in the

1 inside-out configuration, the activation time constant is in the same range as that of HEK293
2 cells³⁰.

3 Remarkably, our rapid mixing experiments show that more than 70% of the relative
4 movements of positions 136/101, 135/72 and 133/103 in the ECD and 33/160 and 250/197 at
5 the ECD/TMD interface occur with very fast kinetics and are completed in less than 2 ms. In
6 contrast, at position 243, this fast component accounts for only 40% of the fluorescence
7 change, with 30% and 20% of the changes subsequently occurring with time constants of 5-24
8 ms and 24-385 ms, respectively. Hence, the great majority of the fluorescence changes
9 precedes receptor activation. The idea that the global conformational changes are not directly
10 associated with channel opening is further supported by the mBBr250-W160F and mBBr243-
11 I201W mutants, which report robust motions at the top of the TMD without channel opening.
12 It is also in line with the observation that the fluorescent changes are elicited at lower proton
13 concentrations than the electrophysiological response. We thus propose a kinetic scheme
14 where a global “pre-activation” step first occurs in under 5 milliseconds, involving the whole
15 ECD compaction and the outward motion of the M2-M3 loop, followed by a slower and more
16 localized transition for channel opening (Fig. 6). This latter motion is likely related to the
17 fluorescence changes observed in the 5-385 ms range, that are particularly marked for the 243
18 reporter which is located nearby the channel gate. Interestingly, several mutants and a wild-
19 type GLIC C-terminally tagged with 10 histidines, were found to crystallize in several locally-
20 closed “LC” conformations characterized by an overall conformation of the ECD nearly
21 identical to GLIC_{pH4}, but with a closed channel^{10,17,39,40}. Among these LC conformations, the
22 structures of GLIC Cys33-Cys245 and GLIC E243P show a particularity with the M2-M3
23 loop revolved outwards, identically as for GLIC_{pH4}, but still with a closed ion channel. This
24 particular LC conformation could thus be a plausible candidate for the pre-active state
25 identified through the stopped-flow recordings.

26

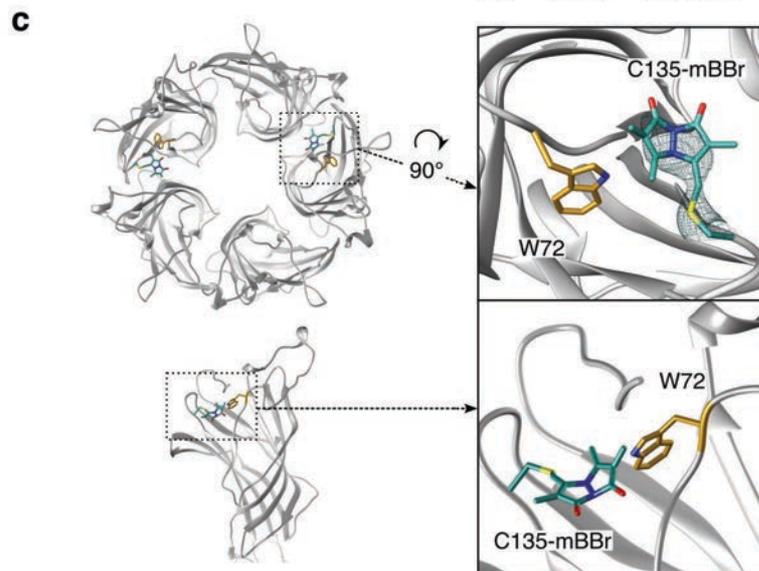
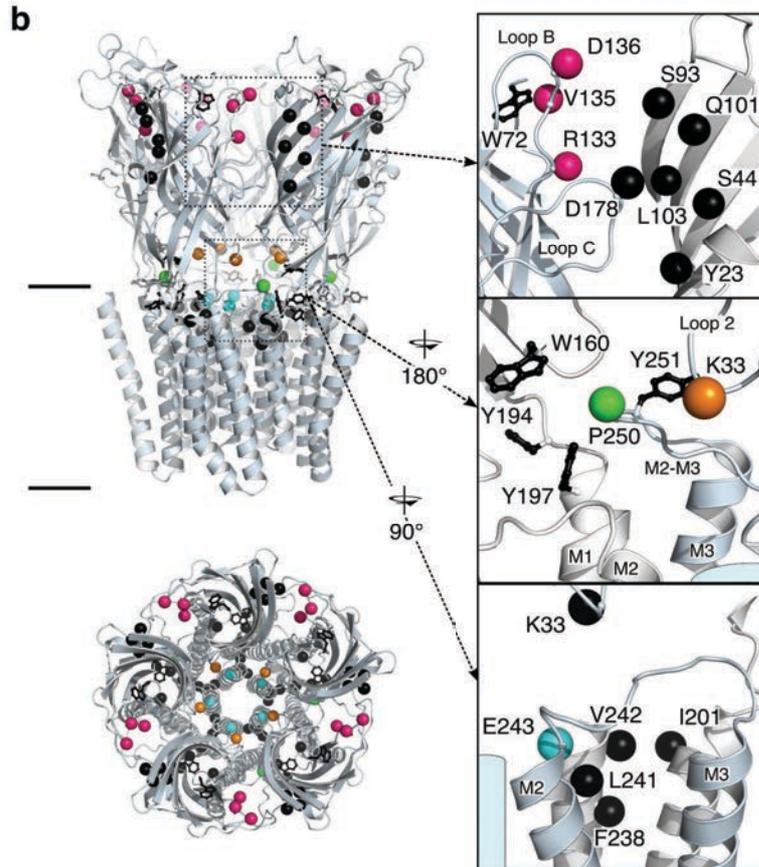
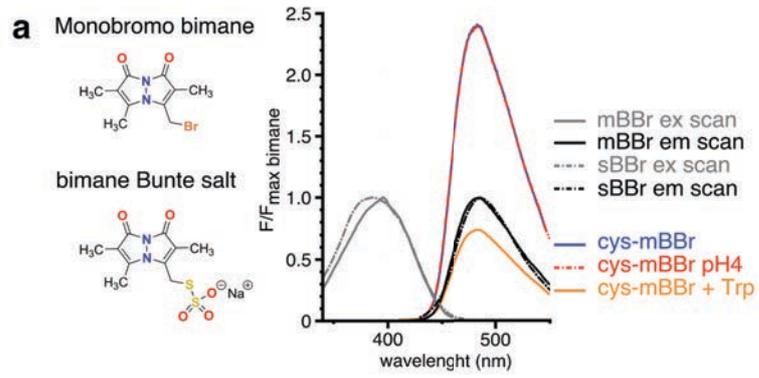
27 Concerning desensitization, we observe small fluorescence changes in the 385 ms-30 s range
28 for all positions, suggesting minor reorganizations at these positions. Interestingly, previous
29 analysis of the desensitization mechanism of GLIC by EPR³⁰, and of other pLGICs by
30 mutagenesis⁴¹ and by NMR⁴² support the view that desensitization proceeds through a
31 narrowing of the bottom part of the channel. Additionally, the X-ray structure of a putative
32 desensitized conformation of a GABA_A receptor¹³ is in line with this idea. Therefore,
33 desensitization might occur through reorganizations in the TMD with comparatively smaller

1 motion at the ECD and particularly at the ECD-TMD interface, as schematically depicted in
2 Figure 6b.

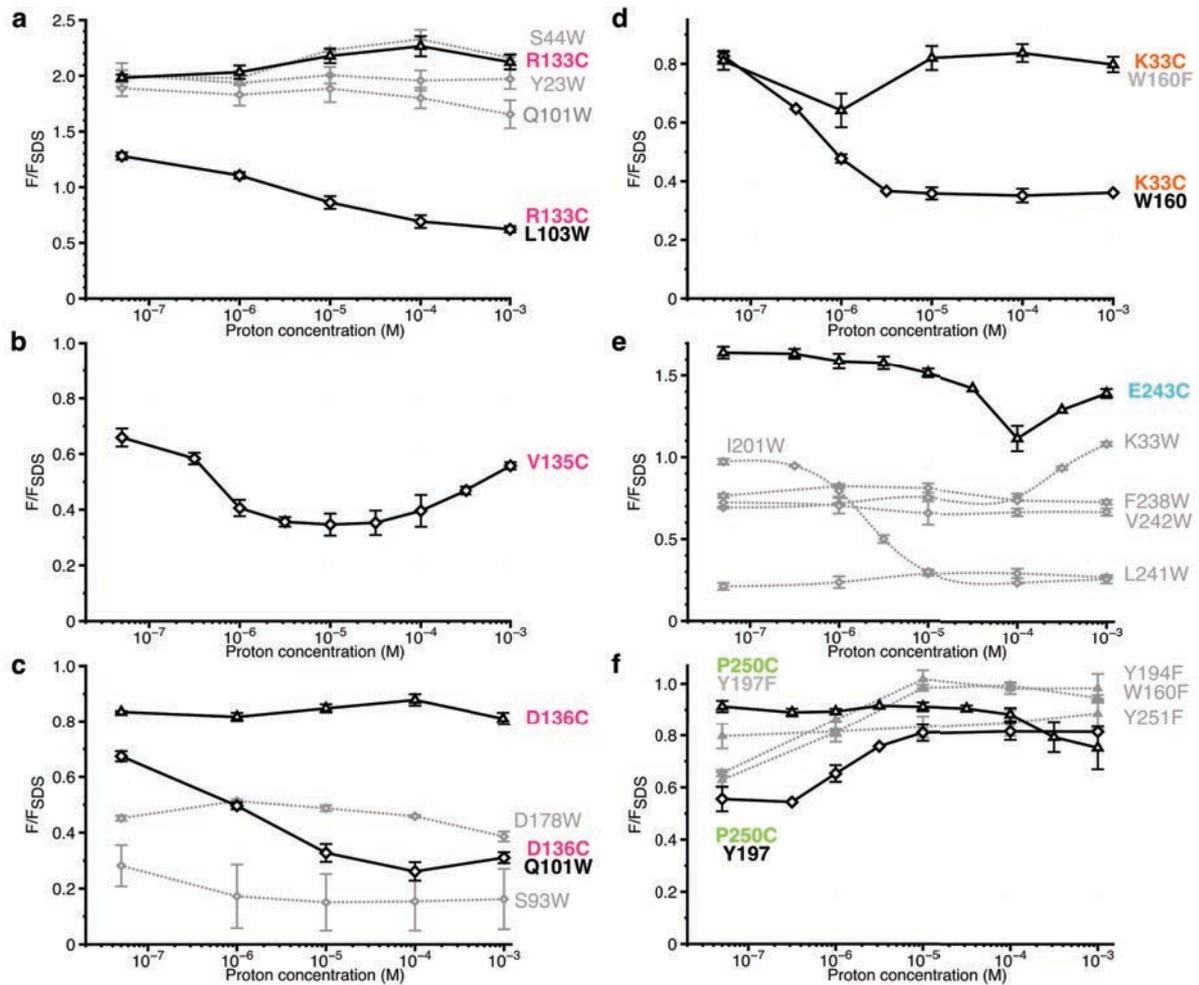
3 Interestingly, electrophysiological recordings of eukaryotic pLGICs also identified pre-active
4 states. First, single-channel kinetic analysis identified short-lived intermediate states in the
5 course of activation, named “flip” and “prime”, where agonist affinity is increased as
6 compared to the resting state but where the channel is closed^{5,43}. Second, ϕ -value analysis
7 following extensive mutational analysis of the muscle nAChR suggest that the top of the ECD
8 around the orthosteric pocket, as well as the M2-M3 loop (notably at an homologous position
9 to GLIC-P250), move early in the course of the gating transition towards the active state⁴⁴.

10 Our direct monitoring of electrophysiologically silent states by the Trp/Tyr IQ method allows
11 us to structurally describe a pre-active state and propose a pre-activation mechanism, which
12 thus not only sheds light on the gating mechanism of the pLGIC model GLIC, but also
13 provides a structural template to investigate the gating of eukaryotic and mammalian
14 receptors.

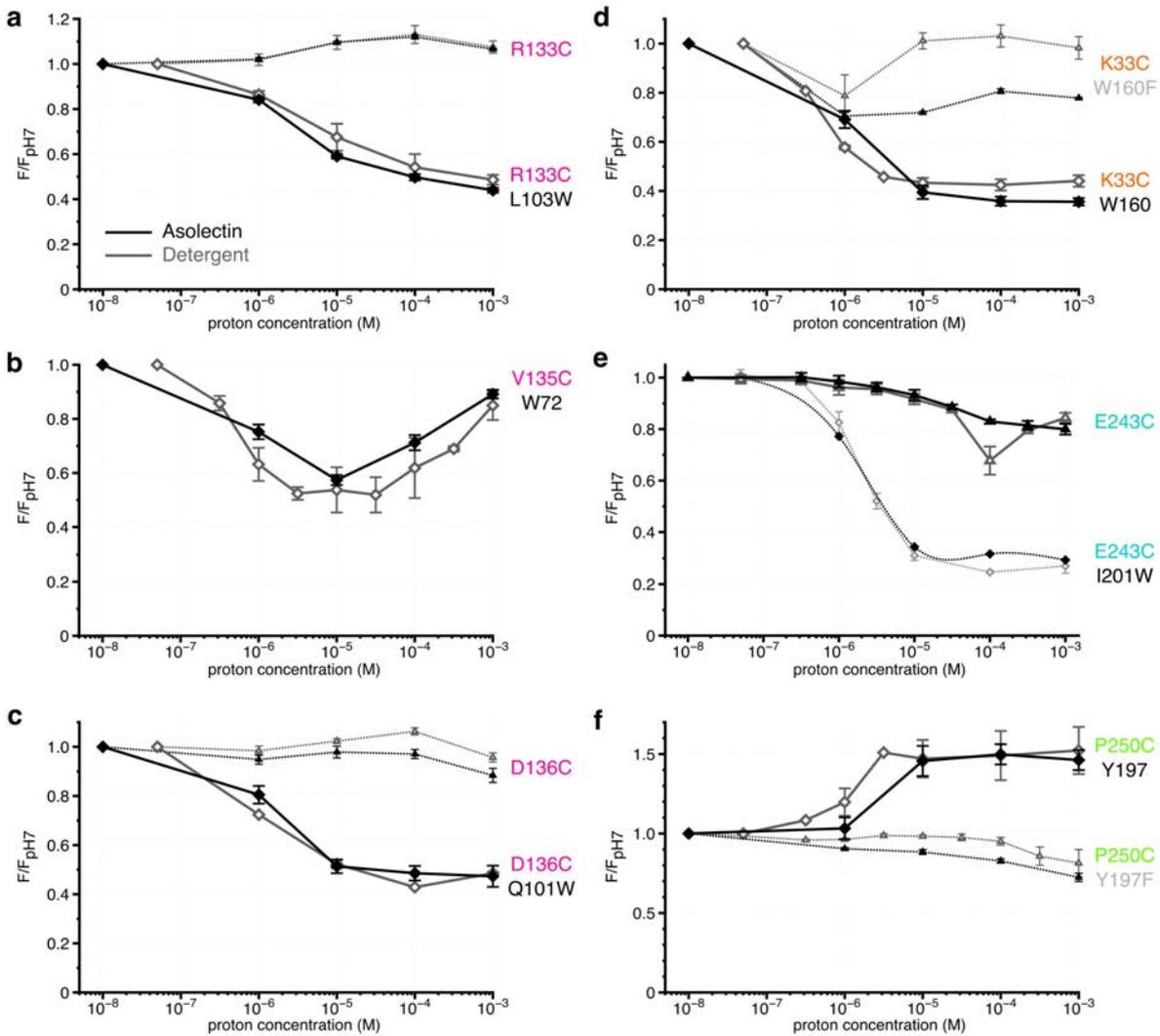
15
16
17
18
19



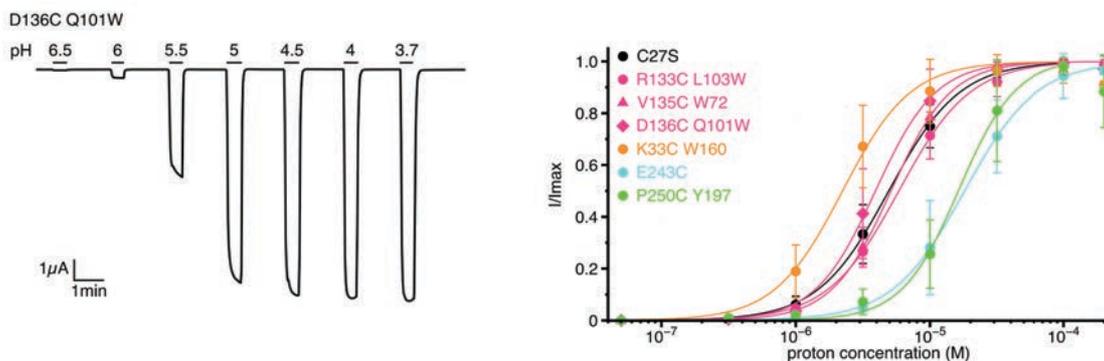
1 **Figure 1:** Bimane and GLIC characteristics. **a:** Left: Structures of the Monobromo bimane
2 (mBBr) and the bimane Bunte salt (BBs). Right: Excitation and emission spectra of both
3 fluorophores and emission spectra of the mBBr (10 μ M) after reaction with cysteines (1mM),
4 acidification of the medium (pH4) or addition of tryptophan (25mM). All spectra are
5 normalized to the peak intensity of the mBBr emission spectrum. **b:** Structure of GLIC. Top
6 panel: side view of GLIC crystalized at pH7. Lower panel: Top-down view of GLIC. Insets
7 show particular regions targeted for mBBr labeling. Positions where cysteines are engineered
8 are represented in color and positions for tryptophan/tyrosine mutations are in black. All
9 amino acids are represented by a sphere for the C β carbon, to show the orientation of the side
10 chain. Endogenous tryptophans and tyrosines are in stick representation. **c:** X-ray structure of
11 the V135C-bimane. A top and side view are presented showing the localization of the two
12 mBBr molecules resolved in the structure. Insets show a zoom for both the top and side view
13 of the V135C-mBBr and the putative quencher W72. In the top zoom, the density for the
14 mBBr is shown in mesh.



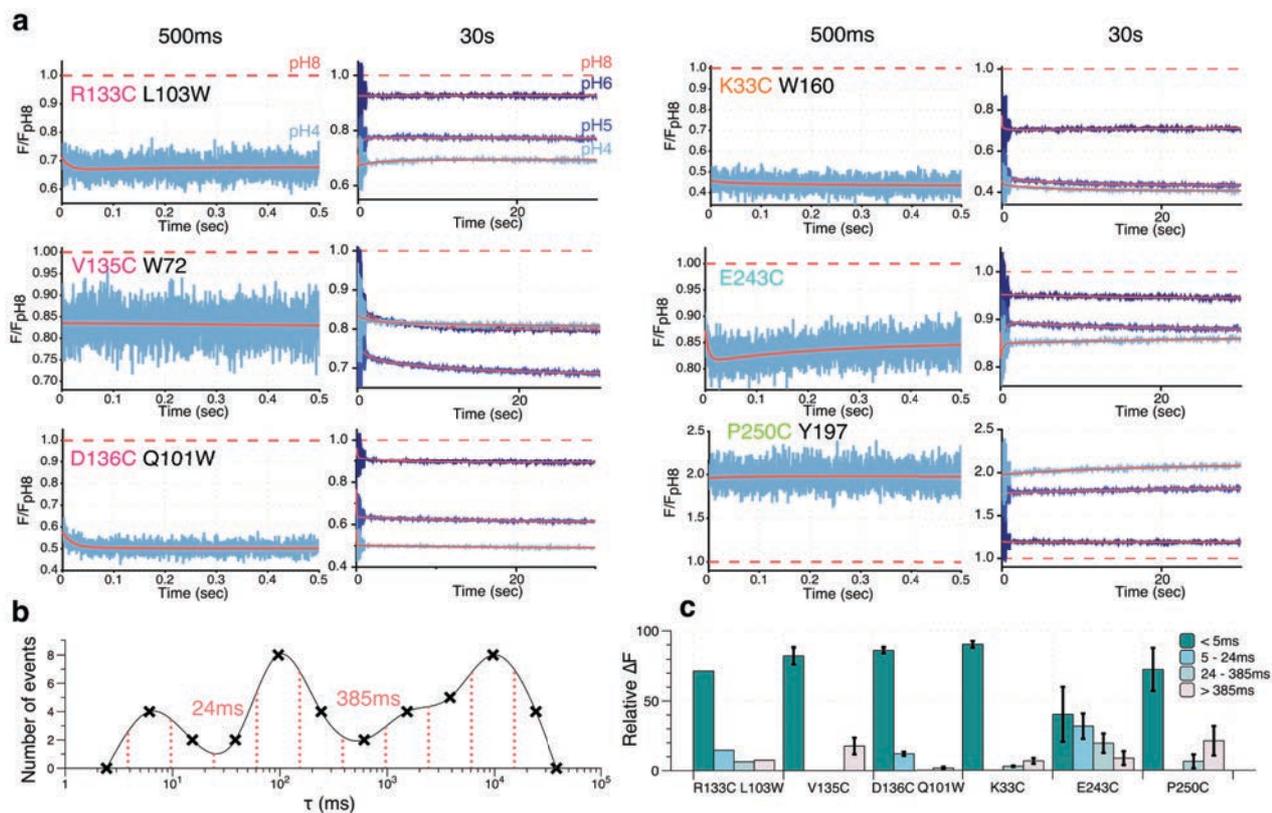
1 **Figure 2:** Steady-state variations of fluorescence of mBBR-GLIC mutants in detergent. **a, b, c,**
 2 **d, e, f:** The data show the fluorescence peak value normalized to the peak intensity after SDS
 3 treatment. The color code is identical to that of figure 1, major quenching pairs are shown in
 4 bold caption and secondary tryptophan quenchers are captioned in grey. Error bars represent
 5 the standard deviation.
 6



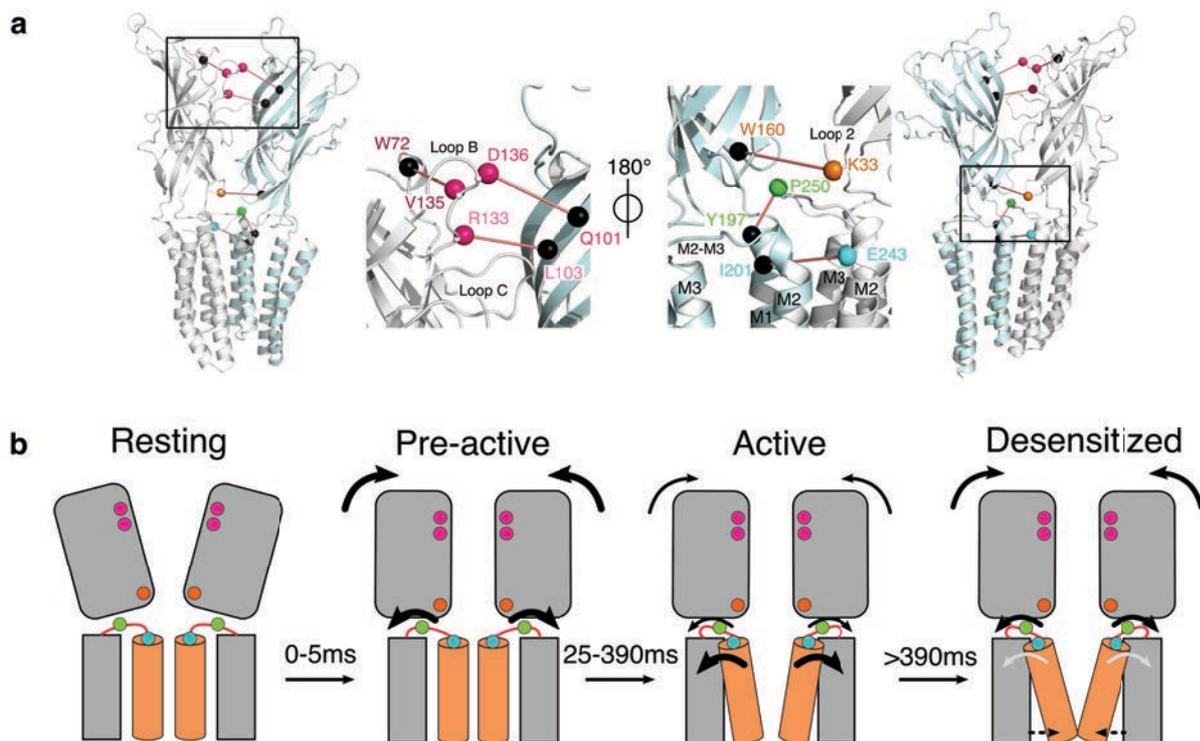
1 **Figure 3:** Steady-state fluorescence of mBBr-GLIC in liposomes. **a, b, c, d, e, f:** The data
 2 show the fluorescence peak value for a given pH, normalized to the peak intensity of each
 3 mutant at pH7. Dark lines represent the fluorescence values in liposomes and grey lines in
 4 detergent, for comparison. Plain lines represent the major quenching pair and dashed lines the
 5 corresponding mutant in absence of quencher.



6 **Figure 4:** Electrophysiological characterizations. The left panel represents a typical dose-
 7 response of the D136C-Q101W mutant labeled with BBs. The right panel shows the dose-
 8 response fits to a Hill equation for all the major quenching pairs. Error bars are standard
 9 deviations.



1
2 **Figure 5:** Stopped-flow fluorescence measurements. **a:** Each panel shows representative
3 traces of the major quenching mutants with a zoom on the first 500ms (left) and the entire
4 recording (right). All traces are fitted to a multi-exponential (see methods) represented in red.
5 The color code is identical in each panel with a blue gradient starting from pH6 (dark) to pH4
6 (light). The red dash line represents the starting fluorescence at pH8. **b:** Binning of τ values
7 extracted from the stopped-flow multi-exponential fit (all pHs and all constructs were used for
8 the plot). The binning interval is of 0.4 and the resulting bins are shown by red dashed lines
9 on the plot. The distribution shows three major clusters for which the according τ value is
10 indicated on the plot. **c:** Fluorescence variations (calculated as a % of the overall variation at
11 30s) for each time interval extracted from the binning plot. Error bars are calculated as
12 standard deviations.



1 **Figure 6:** Conformational motions summary. **a:** Global and zoomed in view of the GLIC_{pH7}
 2 structure, representing only two subunits, with the left structures viewed from the outside of
 3 the pentamer and the right structures from the inside. All major quenching pairs are
 4 represented by a sphere, colored for the mutation to cysteine and bimane labeling, and black
 5 for the corresponding quencher. All pairs are captioned in the same color and jointed by a red
 6 line. **b:** Hypothetic kinetic scheme for the GLIC structural reorganizations. The large arrows
 7 represent the major recorded fluorescence variations and the small arrows represent minor
 8 variations.

1 **Methods**

2

3 **Buffers and chemicals**

4 Buffer A consists of 20 mM Tris and 300 mM NaCl, adjusted to pH7.4 unless otherwise
5 stated.

6 Buffer B consists of 300 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.3 mM Na₂HPO₄ and 1.5 mM KH₂PO₄,
7 adjusted to pH8 unless otherwise stated. Both buffers were supplemented with 0.02% DDM
8 (Anatrace) when specified.

9 MBS buffer consists of 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.5 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 0.7
10 mM CaCl₂ and 1 MgSO₄.

11 MES buffer consists of 100 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ and 10
12 mM MES.

13 CHO labeling buffer consists of 150 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.9 mM NaH₂PO₄, 0.1
14 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂, adjusted to pH7.4.

15 CHO conservation buffer consists of 160 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM
16 MgCl₂, 10 mM HEPES and 8 mM glucose, adjusted to pH7.4.

17 Monobromo bimeane (ThermoFisher Scientific) was dissolved in 100% DMSO at 10 mM and
18 stored at -20°C.

19 Bimeane Bunte salt was dissolved at 50 mM in water and stored at -80°C.

20

21 **Mutagenesis**

22 All GLIC constructs were generated using the molecular probe mutagenesis kit
23 (ThermoFisher Scientific) on the Cys-less background (C27S) in two vectors previously
24 described²⁰, constructed as follows:

25 - The pmt3 vector for eukaryotic expression with an a7 peptide signal and a HA-tag in the C-
26 terminal of GLIC.

27 - The pet20b vector for prokaryotic cells, expressing GLIC as an MBP (in the N-terminal)
28 fusion protein.

29

30 **Protein Production and fluorophore labeling**

31 MBP-GLIC was produced as previously described⁸, in BL21 *E.Coli* strains. Briefly, MBP-
32 GLIC was produced at 20°C in BL21 bacteria after IPTG (20 mM) induction. After cell
33 disruption by sonication, membranes were separated through ultracentrifugation (40'000 rpm)
34 and MBP-GLIC extracted in Buffer A 2% DDM overnight. MBP-GLIC was purified on an

1 amylose resin and eluted by maltose addition in Buffer A 0.02% DDM. Proteins were run on
2 a gel filtration (superpose 6 10/300 GL (GE Healthcare)) column for removal of remaining
3 maltoporin contaminants. The MBP was subsequently cleaved from GLIC by addition of
4 thrombine (Merck Millipore) overnight, and GLIC purified again through gel filtration in
5 buffer A 0.02% DDM. For receptors bearing the K33C and E243C mutations, the protein was
6 incubated for 1 hour with 10 mM DTT prior to the gel filtration to reduce potential disulfide
7 bridges. Pentameric GLIC was then incubated with mBBr at a 5 molar excess ratio (monomer
8 1:5 mBBr) while ensuring the final DMSO concentration did not exceed 0.1%, overnight,
9 under agitation, at 4°C. Excess fluorophore was removed by gel filtration and GLIC-labeled
10 samples flash frozen for storage at -80°C.

11

12 **Liposome reconstitution**

13 Powdered asolectin extracted from soybean (Sigma Aldrich) was solubilized in buffer B at a
14 concentration of 10 mg/mL using a potter, and either used fresh or aliquoted and frozen at -
15 20°C for later uses. GLIC was reconstituted in liposomes with a 1:5 GLIC/asolectin w:w
16 ratio. For 200 µg of protein reconstitution, the following procedure was used and all the steps
17 performed at room temperature: 1 mg of asolectin in Buffer B was mixed with DDM to reach
18 a final DDM concentration of 0.7% and the solution equilibrated for 40 min to solubilize the
19 pre-formed multilayered liposomes. The 200 µg of protein in buffer A 0.02% DDM was
20 added to the solution and the overall volume brought to 1 mL to lower the DDM
21 concentration to 0.2%, followed by equilibration for 1.5 hours under gentle agitation. For
22 liposome formation and gentle inclusion of the protein, detergent was removed by
23 incremented step addition of bio-beads (Biorad) pre-activated using methanol (50 mg, 150 mg
24 and 300 mg). Bio-beads were removed through light centrifugation and the proteoliposomes
25 were either used fresh or stored at 4°C for a maximum of 4 days.

26

27 **Steady-state fluorescence recordings**

28 All fluorescence recordings were done on a Jasco 8200 fluorometer. Buffers and proteins
29 were equilibrated at room temperature before each recording which were made at 20°C.
30 mBBr and GLIC-mBBr samples were excited at 385 nm and their emission spectra were
31 recorded from 420 to 530 nm through 2 nm slits at excitation and emission. Scan speed,
32 sampling and PMT values were kept constant for all measures for subsequent comparisons.
33 The membrane receptor GLIC being activated by protons ($\text{pH}_{50}=5,3$)²⁰, we confirmed that
34 both the mBBr fluorescence and its quenching properties are identical in proton

1 concentrations ranging from pH8 to pH3 (Supplementary results Figure S1). Control
2 experiment with the Cys-less GLIC treated with bimane show negligible non-specific
3 fluorescence (Supplementary results Figure S3). All measurements were made on 1 mL of
4 protein sample in disposable UV transparent 2.5 mL cuvettes (Sigma). As a consequence to
5 the small volumes used, it was not possible to precisely acidify the protein sample using
6 concentrated acid, or diluted acid without considerably changing the final concentrations of
7 ions and protein. Hence measurements were made after mixing one volume of protein in
8 Buffer A 0.02% DDM, with one volume of Buffer B 0.02% DDM previously acidified by 1
9 M HCl to reach, after mixing, the desired pH value. The same mixing protocol was used for
10 the protein samples reconstituted in asolectin. For every recording, the fluorescence emission
11 spectra were stable over multiple recordings, not showing signs of fluorophore bleaching. For
12 each pH tested, tryptophan emission spectra were recorded (excitation at 280 nm) to ensure
13 the proteins did not suffer denaturation and all fluorescence changes were reversible upon
14 return to pH7 (data not shown).

15

16 **Stopped-flow fluorescence recordings**

17 Recordings were made on a SFM-300 stopped-flow apparatus (BioLogic Science
18 Instruments). To ensure lamp and temperature stability, the apparatus was turned on and
19 equilibrated at 20°C for at least one hour before recordings. Excitation was set at 485 nm
20 through an 8 nm slit and emission fluorescence recorded through a 420 nm high-pass filter. A
21 two-syringe injection system was used where syringe one was loaded with the protein sample
22 in buffer B at pH8, and syringe two loaded with buffer B equilibrated at specified pHs. The
23 injection volume was 150 μ L for each syringe at an injection speed of 8.7 mL/s (total speed of
24 17.4 mL/s) resulting in a 2.1 ms mixing dead time. Recordings were made through three
25 sampling times: 500 ms with a 100 μ s sampling, 1 sec with a 1 ms sampling, and 30 sec (or
26 until a plateau was reached) with a 50 ms sampling time. The fluorescence data of the highly
27 variable first 3 ms were removed from analysis, yielding a 5.1 ms total “non-analyzed” data
28 (3 ms + 2.1 ms dead-time). Data were analyzed using Datagraph (Visual data tools) and fitted
29 to a maximum three exponentials equation:

$$30 \quad y(x) = F + (F1 * \exp(-k1 * x) + F2 * \exp(-k2 * x) + F3 * \exp(-k3 * x))$$

31 with F representing the final fluorescence intensity, F1,2,3 representing the Δ fluorescence of a
32 particular exponential phase and k1,2,3 the kinetic constant for each exponential phase in s^{-1} .
33 Systematic background fluorescence recordings of buffers were done and subtracted from the

1 data. For each condition a mean of 10 traces was counted as n=1 and all conditions were
2 recorded with n=3 or 4. Each mean of 10 was fitted individually.

3

4 **Electrophysiological recordings**

5 Functional recordings of GLIC were made on *Xenopus* oocytes provided by the Centre de
6 Ressources Biologiques Xénopes–Rennes (France). Electrophysiological recordings were
7 made as previously described⁴⁵ after 48-96 h of expression, with the difference that oocytes
8 were clamped at -40 mV for recordings and data analyzed using AxoGraph X. For recordings
9 of GLIC after reaction with BBs, oocytes were incubated for 1 hour at room temperature,
10 under very gentle agitation in MBS 1 mM BBs. GLIC proteins bearing the mutations K33C or
11 E243C were treated with 10 mM DTT 10 minutes prior to BBs labeling. After labeling, all
12 oocytes were rinsed in MBS buffer and recorded within 1 hour post-labeling. For all mutants,
13 currents were recorded on non-labeled oocytes, followed by labeling and re-recording on the
14 same oocytes. Independent mutants-expressing oocytes were also used for current recordings
15 after labeling without prior non-labeled recordings. Both methods led to similar results and
16 the pH₅₀ and nH values are given for a mix of oocytes recorded with the different methods.
17 An exception was made for the P250C-Y197F mutant that showed a notable run-down after
18 activation to be recorded several times, in this case currents after BBs labeling were recorded
19 on fresh oocytes. Mutants leading to currents smaller than 500 nA at high agonist
20 concentrations (pH4) were categorized as non-functional.

21

22 **CHO culture, transfection and labeling**

23 Chinese hamster ovary (CHO) cells were cultured in Ham's F-12K Kaighn's modification
24 medium (ThermoFisher Scientific) supplemented with 10% fetal calf serum and containing
25 penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL).

26 Cells were plated in 35 mm diameter polystyrene plates (Falcon) and transfected with GLIC
27 cDNA and mCherry cDNA, as a transfection control, using a JetPRIME kit (Polyplus
28 Transfection) according to the manufacturer's instructions. Protein expression was allowed
29 for 48-72 h before cell labeling.

30 Throughout the labeling process, cells and buffers were kept at 4°C to avoid endocytosis of
31 the fluorophore. For labeling with BBs, cells were rinsed three times (5-10 min, gentle
32 agitation, 4°C) in labeling buffer and incubated for 1 hour with 1 mM BBs in labeling buffer.
33 They were then rinsed two times with labeling buffer (5-10 min, gentle agitation, 4°C) and
34 kept in conservation buffer at room temperature during the imaging process.

1 **Confocal microscopy**

2 Confocal laser scanning of fluorescence was performed using an Ultima scanning head
3 (Bruker Fluorescence Microscopy, Middleton, USA) mounted on an Olympus BX61W1
4 microscope and equipped with a 60x (1.1 NA, Olympus Optical, Tokyo, Japan) water
5 immersion objective. Bimane and mCherry were excited with a 405 nm and 594 nm diode
6 lasers respectively. Emitted fluorescence was descanned, and aligned through a 150 or 100 μ m
7 pinhole, placed on a conjugate image plane. Fluorescent emission from Bimane was filtered
8 with a 525/50 nm band pass filter and detected in gallium arsenide phosphide-based
9 photocathode photomultiplier tube (H7422P, Hamamatsu Photonics). mCherry fluorescence
10 was filtered with a 605/70 band pass filter (all filters were from Croma) and detected in a
11 side-on multi-alkali PMT (3896, Hamamatsu Photonics).

12

13 **Crystallography**

14 The bimane labeled GLIC V135C was crystallized in the same conditions as WT GLIC⁴⁶. The
15 crystals were directly flash-frozen in liquid nitrogen prior to data collection. Data sets were
16 collected on the PROXIMA1 beamline of the SOLEIL synchrotron, Gif-sur-Yvette, France.
17 Reflections were integrated using XDS⁴⁷ and further processed using programs from the
18 CCP4 suite⁴⁸. As expected, the crystals were isomorphous to the previously described crystal
19 lattice of the open receptor and belonged to space group C121 (unit-cell parameters:
20 $a=182.034$ Å, $b=134.075$ Å, $c=159.945$ Å, $\alpha=\gamma=90.00^\circ$, $\beta=102.51^\circ$) with one pentamer in the
21 asymmetric unit (see supplementary results Table 6).

22 The phases were directly calculated by performing rigid-body refinement with REFMAC5⁴⁹
23 using PDB entry 3EAM⁸ as a starting model. The structure was then subjected to restrained
24 refinement with REFMAC5 using NCS restraints. As the covalent link between the bimane
25 and the cysteine side chain is non-standard, its description was defined in an additional library
26 and incorporated in the pdb file. The resulting model was subsequently refined by BUSTER⁵⁰.
27 The final structure was validated using the MolProbity web server⁵¹.

28 The PDB accession code is 5IUX.

29

30 **Bimane Bunte salt synthesis**

31 **General:** Commercially available reagents were used throughout without further purification.
32 Analytical thin layer chromatography was performed on Merck 60F-254 precoated silica (0.2
33 mm) on glass and was revealed by UV light. ¹H and ¹³C NMR spectra were recorded on a
34 Bruker AC 300 apparatus at 300 MHz and 75 MHz respectively. The chemical shifts for ¹H

1 NMR were given in ppm downfield from tetramethylsilane (TMS) with the solvent resonance
2 as the internal standard. HRMS (ESI) analysis was performed with a time-of-flight mass
3 spectrometer yielding ion masse/charge (m/z) ratios in atomic mass units. Purity of
4 synthesized compound was determined by reverse phase HPLC using a 150 mm x 2.1 mm
5 (3.5 μ m) C18-column: the compound was eluted over 24 min with a gradient from 95% ACN/
6 5% (H₂O+0.1% HCO₂H) to 5% ACN/ 95% (H₂O+0.1% HCO₂H). Note that the use of formic
7 acid in elution solvent gave the corresponding thiosulfonic acid.

8

9 **Typical procedure for Bimane Bunte salt (BBs):**⁵² To a solution of bromobimane (50 mg,
10 0.18 mmol, 1.0 equiv.) in a mixture of water (105 μ L) and MeOH (300 μ L), was added
11 sodium thiosulfate pentahydrate (54.6 mg, 0.22 mmol, 1.2 equiv.). The reaction was stirred at
12 65°C for 5 h and cooled to room temperature. After evaporation of the solvent under reduced
13 pressure, the crude reaction product was treated with MeOH (0.5 mL), heated to 50°C and
14 filtered. The filtrate was concentrated in vacuo to furnish a yellow solid which was triturated
15 with hexane, filtered and dried at 50°C under vacuum providing the expected BBs in 80%
16 yield (47 mg) as a yellowish solid. The 81.4% purity of BBs (t_R = 11.65 min) was determined
17 by reverse phase HPLC (λ = 235 nm). This solid did not display a melting point but rather
18 decomposition. ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ 4.43 (s, 2H), 2.47 (s, 3H), 1.93 (s, 3H), 1.83 (s,
19 3H); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O/MeOD): δ 164.0, 163.4, 150.8, 148.2, 115.3, 112.7, 12.1, 7.1,
20 6.6; HRMS (m/z): [M + H]⁺ calcd for C₁₀H₁₃N₂O₅S₂, 305.0260; found 305.0260.

21

22 **Acknowledgments:** We would like to thank Alain Chaffotte for his help in setting up the
23 stopped-flow experiments, Nelson Rebola and David DiGregorio for assistance in the
24 confocal microscopy recordings. We also thank Karima Medjebeur for aid in protein
25 production and Jean-Pierre Changeux, Marc Gielen and Akos Nemezc for critical reading of
26 the manuscript. We acknowledge financial support by the Agence Nationale de la Recherche
27 “ANR pentagate” (A.M.) and the Foundation de la Recherche Médicale “Equipe FRM
28 DEQ20140329497”.

29 **Authors contribution:** AM and PJC designed the work. AM performed most experiments
30 with the help of SNL (GLIC reconstitution and mutagenesis). ZF and MD performed GLIC-
31 BBs crystallization and solved its crystal structure, ED and DJ designed and synthesized the
32 BBs. AM and PJC interpreted the data, with the help of SJE for the stopped-flow data, and
33 wrote the manuscript.

1 **References**

2

- 3 1. Steinlein, O. K. Ion channel mutations in neuronal diseases: a genetics perspective.
4 *Chem. Rev.* **112**, 6334–52 (2012).
- 5 2. Corringer, P.-J. *et al.* Structure and pharmacology of pentameric receptor channels:
6 from bacteria to brain. *Structure* **20**, 941–56 (2012).
- 7 3. Changeux, J.-P. & Edelstein, S. J. Allosteric Mechanisms of Signal Transduction.
8 *Science (80-.)*. **308**, 1424 –1428 (2005).
- 9 4. Burzomato, V., Beato, M., Groot-Kormelink, P. J., Colquhoun, D. & Sivilotti, L. G.
10 Single-channel behavior of heteromeric alpha1beta glycine receptors: an attempt to
11 detect a conformational change before the channel opens. *J. Neurosci.* **24**, 10924–40
12 (2004).
- 13 5. Mukhtasimova, N., Lee, W. Y., Wang, H.-L. & Sine, S. M. Detection and trapping of
14 intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature* **459**, 451–4
15 (2009).
- 16 6. Sakmann, B., Patlak, J. & Neher, E. Single acetylcholine-activated channels show
17 burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* **286**, 71–3
18 (1980).
- 19 7. Hilf, R. J. C. & Dutzler, R. X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated
20 ion channel. *Nature* **452**, 375–379 (2008).
- 21 8. Bocquet, N. *et al.* X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an
22 apparently open conformation. *Nature* **457**, 111–114 (2009).
- 23 9. Hilf, R. J. C. & Dutzler, R. Structure of a potentially open state of a proton-activated
24 pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **457**, 115–8 (2009).
- 25 10. Sauguet, L. *et al.* Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a
26 mechanism for activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 966–71 (2014).
- 27 11. Hibbs, R. E. & Gouaux, E. Principles of activation and permeation in an anion-
28 selective Cys-loop receptor. *Nature* **474**, 54–60 (2011).
- 29 12. Althoff, T., Hibbs, R. E., Banerjee, S. & Gouaux, E. X-ray structures of GluCl in apo
30 states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* **512**, 333–337 (2014).
- 31 13. Miller, P. S. & Aricescu, A. R. Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*

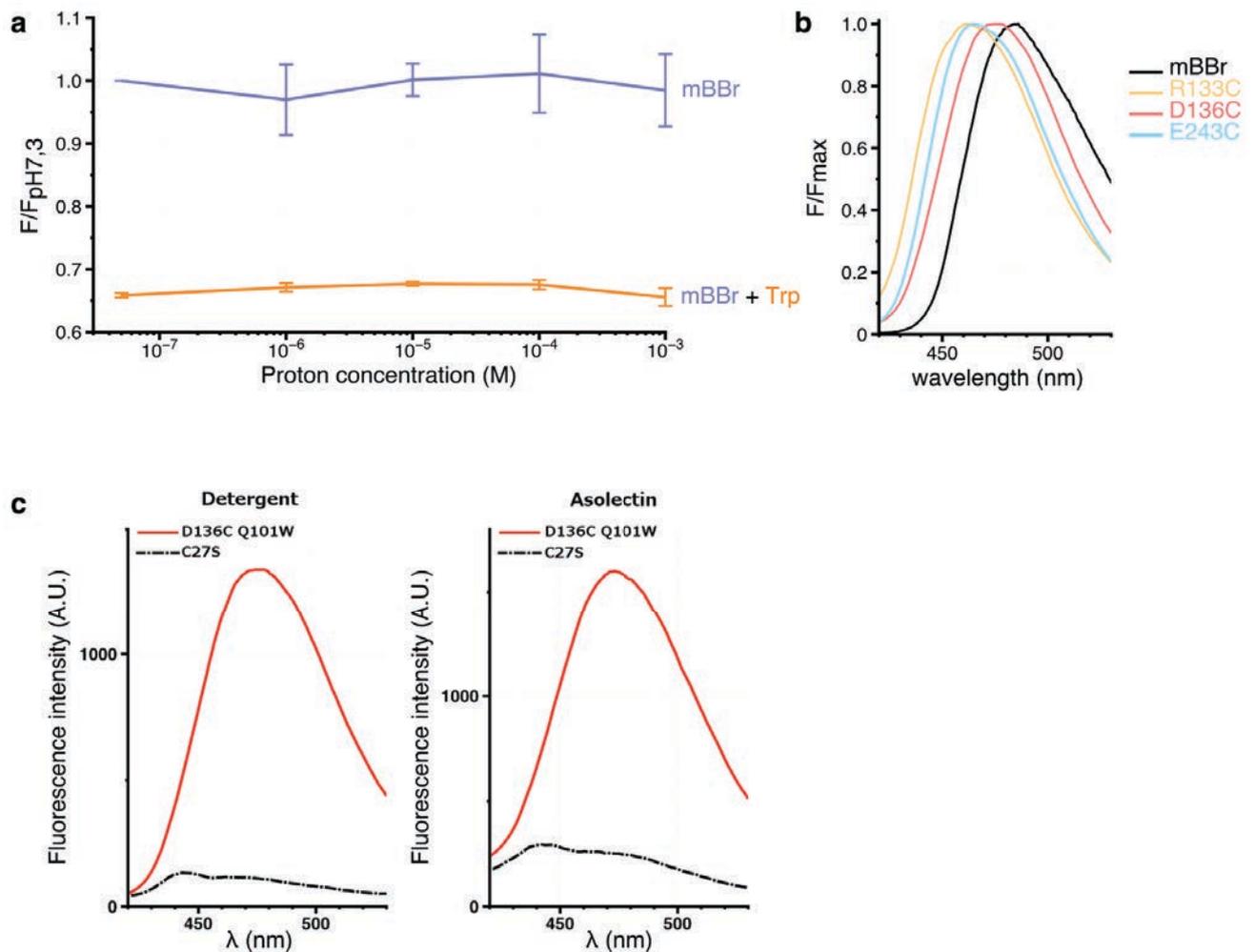
- 1 **512**, 270–275 (2014).
- 2 14. Hassaine, G. *et al.* X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* **512**,
3 276–281 (2014).
- 4 15. Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S. & Shaffer, P. L. Crystal structure of
5 human glycine receptor- α 3 bound to antagonist strychnine. *Nature* **526**, 277–80 (2015).
- 6 16. Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y. & Gouaux, E. Glycine receptor mechanism
7 elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* **526**, 224–229 (2015).
- 8 17. Prevost, M. S. *et al.* A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-
9 gated ion channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 642–649 (2012).
- 10 18. Nury, H. *et al.* X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-
11 gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431 (2011).
- 12 19. Gonzalez-Gutierrez, G. *et al.* Mutations that stabilize the open state of the *Erwinia*
13 chrisanthemi ligand-gated ion channel fail to change the conformation of the pore
14 domain in crystals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 6331–6 (2012).
- 15 20. Bocquet, N. *et al.* A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic
16 acetylcholine receptor family. *Nature* **445**, 116–119 (2007).
- 17 21. Calimet, N. *et al.* A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc.*
18 *Natl. Acad. Sci.* **110**, E3987–E3996 (2013).
- 19 22. Mansoor, S. E., Mchaourab, H. S. & Farrens, D. L. Mapping Proximity within Proteins
20 Using Fluorescence Spectroscopy. A Study of T4 Lysozyme Showing That Tryptophan
21 Residues Quench Bimane Fluorescence[†]. *Biochemistry* **41**, 2475–2484 (2002).
- 22 23. Islas, L. D. & Zagotta, W. N. Short-range Molecular Rearrangements in Ion Channels
23 Detected by Tryptophan Quenching of Bimane Fluorescence. *J. Gen. Physiol.* **128**,
24 337–346 (2006).
- 25 24. Mansoor, S. E., DeWitt, M. A. & Farrens, D. L. Distance Mapping in Proteins Using
26 Fluorescence Spectroscopy: The Tryptophan-Induced Quenching (TriQ) Method.
27 *Biochemistry* **49**, 9722–9731 (2010).
- 28 25. Semenova, N. P., Abarca-Heidemann, K., Loranc, E. & Rothberg, B. S. Bimane
29 Fluorescence Scanning Suggests Secondary Structure near the S3-S4 Linker of BK
30 Channels. *J. Biol. Chem.* **284**, 10684–10693 (2009).
- 31 26. Jones Brunette, A. M. & Farrens, D. L. Distance mapping in proteins using

- 1 fluorescence spectroscopy: tyrosine, like tryptophan, quenches bimane fluorescence in
2 a distance-dependent manner. *Biochemistry* **53**, 6290–301 (2014).
- 3 27. Pless, S. A. & Lynch, J. W. Illuminating the Structure and Function of Cys-Loop
4 Receptors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **35**, 1137–1142 (2008).
- 5 28. Smirnova, I., Kasho, V. & Kaback, H. R. Real-time conformational changes in LacY.
6 *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 8440–8445 (2014).
- 7 29. Labriola, J. M. *et al.* Structural Sensitivity of a Prokaryotic Pentameric Ligand-gated
8 Ion Channel to Its Membrane Environment. *J. Biol. Chem.* **288**, 11294–11303 (2013).
- 9 30. Velisetty, P. & Chakrapani, S. Desensitization mechanism in prokaryotic ligand-gated
10 ion channel. *J. Biol. Chem.* **287**, 18467–18477 (2012).
- 11 31. Martinez, K. L. *et al.* Allosteric transitions of Torpedo acetylcholine receptor in lipids,
12 detergent and amphipols: molecular interactions vs. physical constraints. *FEBS Lett.*
13 **528**, 251–256 (2002).
- 14 32. daCosta, C. J. B., Dey, L., Therien, J. P. D. & Baenziger, J. E. A distinct mechanism
15 for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 701–7
16 (2013).
- 17 33. Dellisanti, C. D. *et al.* Site-Directed Spin Labeling Reveals Pentameric Ligand-Gated
18 Ion Channel Gating Motions. *PLoS Biol.* **11**, (2013).
- 19 34. Hénault, C. M., Juranka, P. F. & Baenziger, J. E. The M4 Transmembrane α -Helix
20 Contributes Differently to Both the Maturation and Function of Two Prokaryotic
21 Pentameric Ligand-gated Ion Channels. *J. Biol. Chem.* **290**, 25118–28 (2015).
- 22 35. Carswell, C. L. *et al.* Role of the Fourth Transmembrane α Helix in the Allosteric
23 Modulation of Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Structure* **23**, 1655–64 (2015).
- 24 36. Gonzalez-Gutierrez, G. & Grosman, C. Bridging the Gap between Structural Models of
25 Nicotinic Receptor Superfamily Ion Channels and Their Corresponding Functional
26 States. *J. Mol. Biol.* **403**, 693–705 (2010).
- 27 37. Parikh, R. B., Bali, M. & Akabas, M. H. Structure of the M2 Transmembrane Segment
28 of GLIC, a Prokaryotic Cys Loop Receptor Homologue from *Gloeobacter violaceus*,
29 Probed by Substituted Cysteine Accessibility. *J. Biol. Chem.* **286**, 14098–14109
30 (2011).
- 31 38. Laha, K. T., Ghosh, B. & Czajkowski, C. Macroscopic Kinetics of Pentameric Ligand

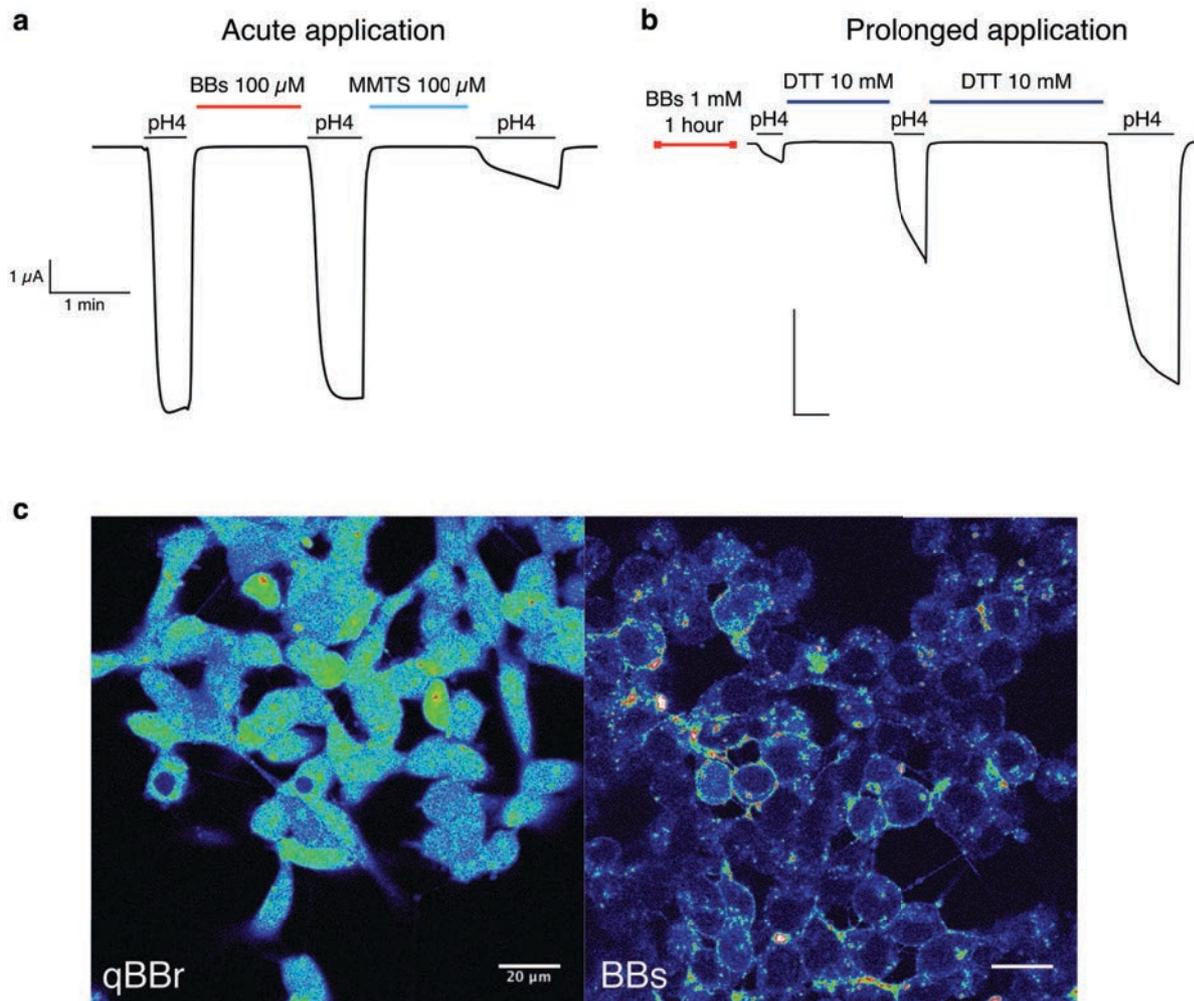
- 1 Gated Ion Channels: Comparisons between Two Prokaryotic Channels and One
2 Eukaryotic Channel. *PLoS One* **8**, e80322 (2013).
- 3 39. Gonzalez-Gutierrez, G., Cuello, L. G., Nair, S. K. & Grosman, C. Gating of the proton-
4 gated ion channel from *Gloeobacter violaceus* at pH 4 as revealed by X-ray
5 crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201313156 (2013).
6 doi:10.1073/pnas.1313156110
- 7 40. Moraga-Cid, G. *et al.* Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on
8 an $\alpha 1$ glycine receptor transmembrane structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**,
9 2865–70 (2015).
- 10 41. Gielen, M., Thomas, P. & Smart, T. G. The desensitization gate of inhibitory Cys-loop
11 receptors. *Nat. Commun.* **6**, 6829 (2015).
- 12 42. Kinde, M. N. *et al.* Conformational Changes Underlying Desensitization of the
13 Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC. *Structure* **23**, 995–1004 (2015).
- 14 43. Lape, R., Colquhoun, D. & Sivilotti, L. G. On the nature of partial agonism in the
15 nicotinic receptor superfamily. *Nature* **454**, 722–7 (2008).
- 16 44. Purohit, P., Gupta, S., Jadey, S. & Auerbach, A. Functional anatomy of an allosteric
17 protein. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
- 18 45. Duret, G. *et al.* Functional prokaryotic–eukaryotic chimera from the pentameric ligand-
19 gated ion channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12143–12148 (2011).
- 20 46. Sauguet, L. *et al.* Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-
21 gated ion channels. *EMBO J.* **32**, 728–741 (2013).
- 22 47. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 125–32 (2010).
- 23 48. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta*
24 *Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 235–42 (2011).
- 25 49. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal
26 structures. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **67**, 355–67 (2011).
- 27 50. Blanc, E. *et al.* Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood
28 in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **60**, 2210–21 (2004).
- 29 51. Chen, V. B. *et al.* MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular
30 crystallography. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **66**, 12–21 (2010).

1 52. Reeves, J. T. *et al.* The reaction of Grignard reagents with Bunte salts: a thiol-free
2 synthesis of sulfides. *Org. Lett.* **16**, 1196–9 (2014).

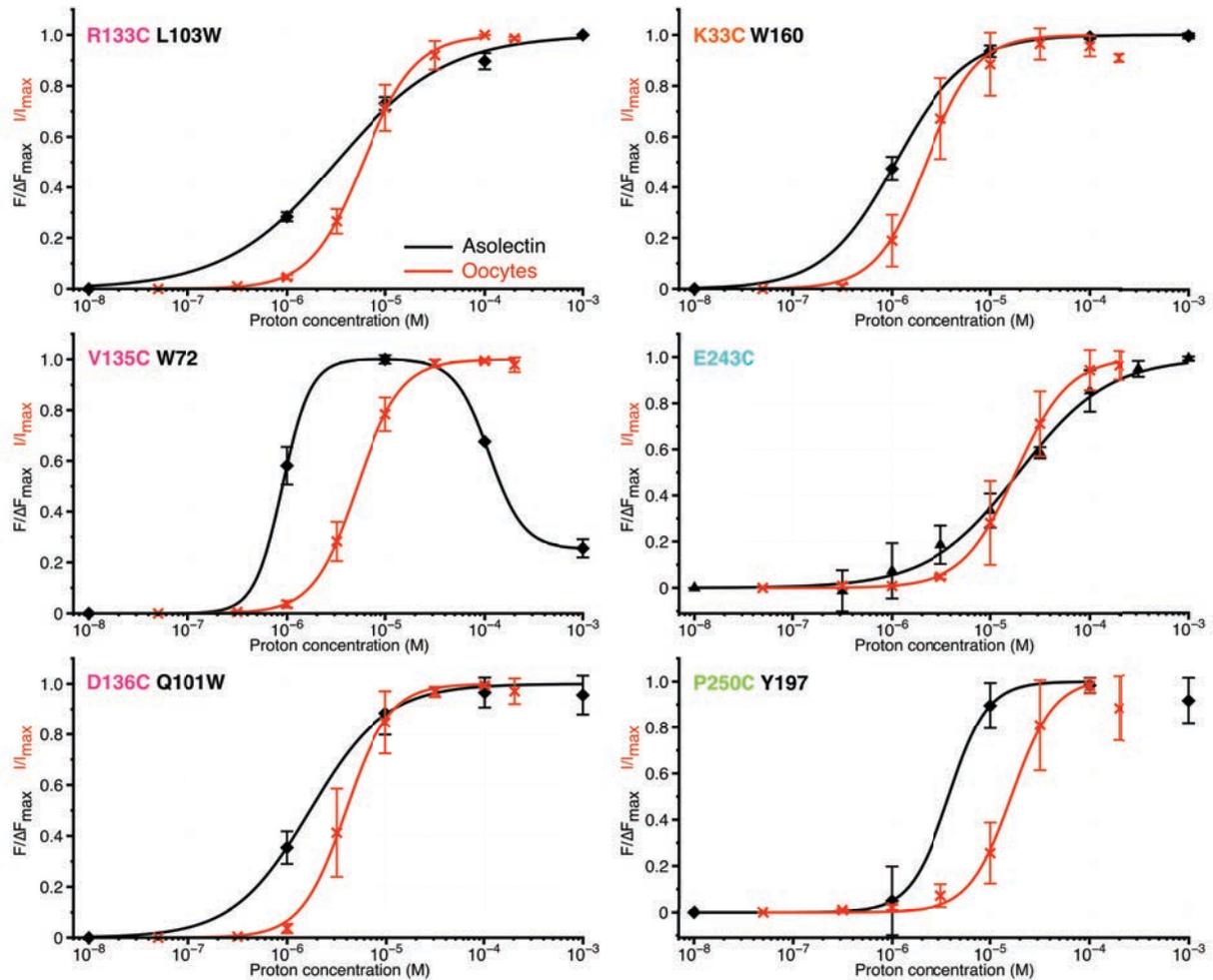
3



1
2 **Supplementary Figure 1:** Spectral characteristics of bimane and mBBR-GLIC mutants. **a:**
3 Variations of peak intensity of cys-mBBR (10 μ M) (purple) and cys-mBBR (10 μ M) + Trp
4 (12.5 mM) (orange) in solution ranging from pH7.3 to pH3. All intensities are normalized on
5 the peak intensity of cys-mBBR at pH7.3. All error bars were calculated as standard deviation
6 on 3 separate experiments. **b:** Emission shifts of mBBR-GLIC mutants. The figure presents
7 emission spectra of the mBBR133, mBBR136 and mBBR243 mutants at pH7.3, along with the
8 emission spectra of the mBBR in solution. Each spectrum was normalized on its maximal
9 value. **c:** Background fluorescence when recording mBBR-GLIC. The figure represents
10 superimposed emission spectra of the cys-less GLIC (C27S) and the D136C Q101W mutant
11 either in detergent or after reconstitution in asolectin liposomes. For both mutants, proteins
12 were treated with mBBR and subsequently purified by gel filtration to remove unreacted
13 fluorophore.

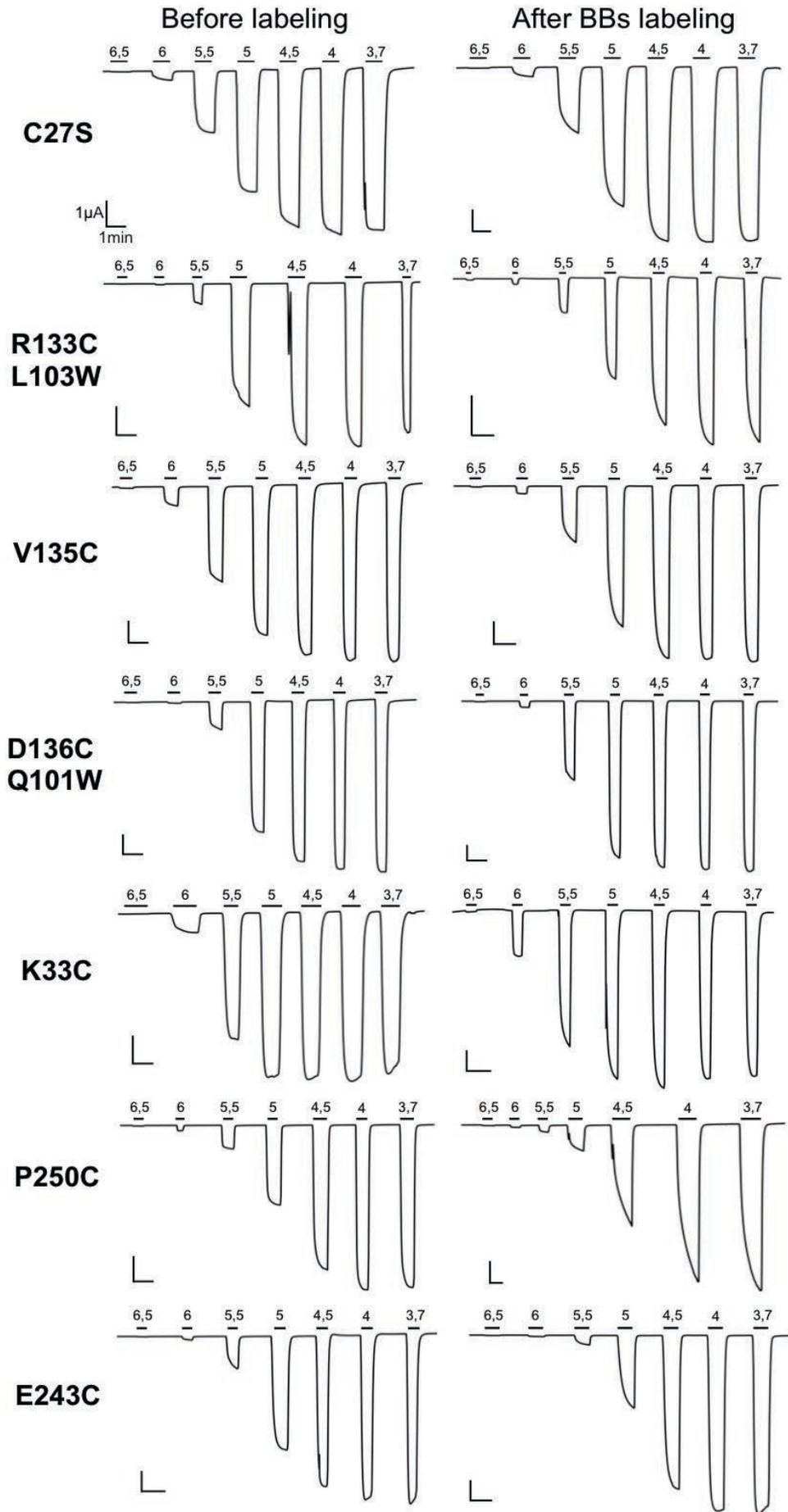


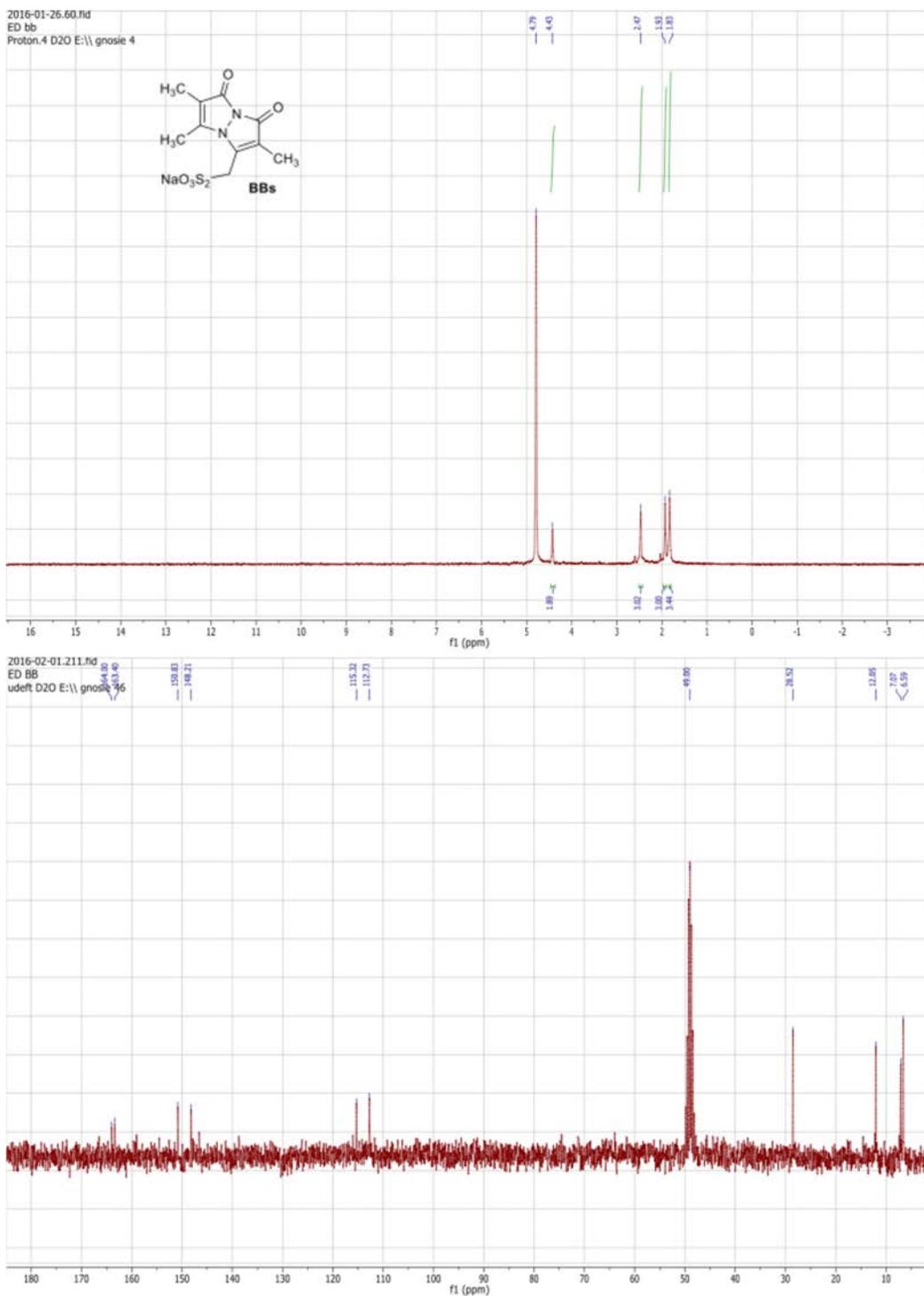
1
 2 **Supplementary Figure 2:** Bimane labeling of cells expressing GLIC. **a, b:**
 3 Electrophysiological recordings of oocytes expressing GLIC Q193C mutant. Unless otherwise
 4 indicated, oocytes were perfused with a pH7.3 solution. **a:** Trace showing the inhibition of
 5 GLIC Q193C after reaction with the MMTS but not the BBs when perfused on the oocyte for
 6 short times. **b:** Trace showing the effective inhibition of GLIC Q193C after reaction with the
 7 BBs after the oocyte was incubated for 1h in presence of the fluorophore, followed by
 8 reduction of the cys-BBs bond by DTT. **c:** Bimane labeling of CHO cells. The pictures were
 9 taken on a confocal microscope with a 405 nm excitation laser and show GLIC D136C
 10 transfected cells, positive for the transfection marker mCherry (not shown). On the right
 11 panel, cells were labeled for 1h, on ice, with the qBBr, a commercially available “non-
 12 permeant” bimane derivative. On the left panel, cells were labeled for 1h, on ice, with the
 13 BBs. The scale bar represents 20 μ m.



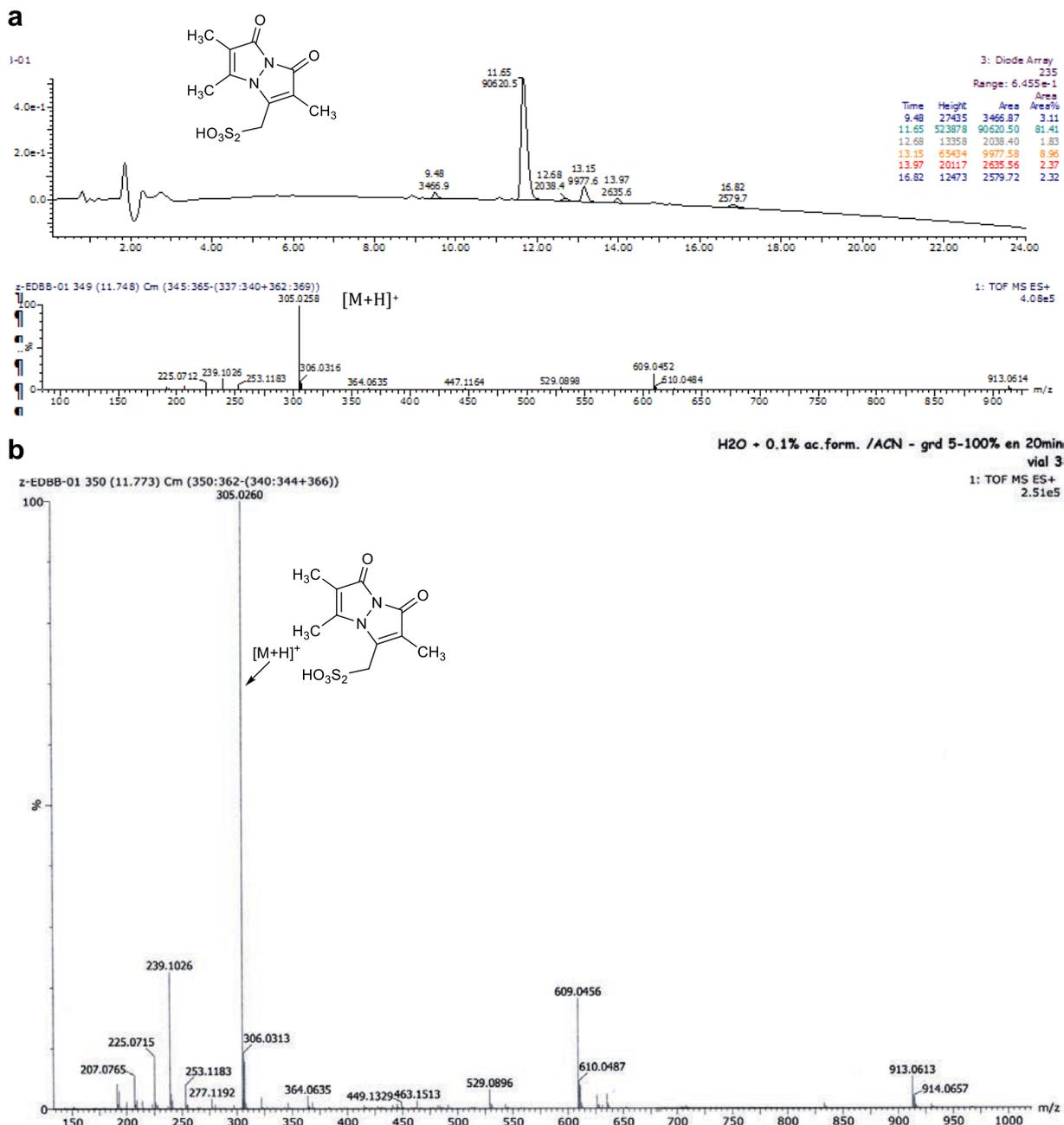
1
 2 **Supplementary Figure 3:** Dose-response curves. Fits to Hill equations for
 3 electrophysiological currents (red lines) and fluorescence values in asolectin liposomes (black
 4 lines) for all major quenching pair mutants. The current and fluorescence are normalized to
 5 their respective maximum. All error bars were calculated as standard deviation.

6
 7
 8
 9
 10
 11 **Supplementary Figure 4:** Typical electrophysiological traces for each major quenching-pairs
 12 mutants of GLIC. On the left are recordings made before BBs labeling and on the right are
 13 recordings made for the same oocyte after a 1h BBs incubation, with the exception of the
 14 P250C mutant which showed an important run down (either with or without labeling) and for
 15 which two different representative oocytes are shown.





1
2 **Supplementary Figure 5:** ^1H NMR (300 MHz, D_2O) and ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{MeOD}$)
3 spectra of the BBs.



1
2 **Supplementary Figure 6: a:** RP-HPLC chromatogram and MS spectrum of bimane
3 thiosulfonic acid. **b:** HRMS (ESI) spectrum of bimane thiosulfonic acid.

4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14

Mutant	F/F_{SDS} in detergent	F/F_{SDS} in Asolectin
R133C	1,98 ± 0,03	1,91 ± 0,02
R133C L103W	1,28 ± 0,03	1,182 ± 0,003
V135C W72	0,66 ± 0,03	0,76 ± 0,03
D136C	0,835 ± 0,003	0,87 ± 0,03
D136C Q101W	0,67 ± 0,02	0,69 ± 0,02
K33C W160	0,83 ± 0,02	1,09 ± 0,03
K33C W160F	0,81 ± 0,08	0,87 ± 0,02
E243C	1,68 ± 0,02	1,60 ± 0,01
P250C Y197	0,55 ± 0,05	0,60 ± 0,01
P250C Y197F	0,93 ± 0,01	1,42 ± 0,08

1
2 **Supplementary Table 1:** Fluorescence values at pH7/8 in detergent or asolectin liposomes.
3 The data presented are the values of fluorescence at the highest tested pH, normalized to the
4 fluorescence after denaturation (1%SDS). All error bars were calculated as standard
5 deviations.

Mutant	Electrophysiology non labeled				Electrophysiology labeled				Fluorescence detergent			Fluorescence liposomes		
	pH50	nH	Imax	n	pH50	nH	Imax	n	pH50	nH	n	pH50	nH	n
C27S	5,31±0,07	1,6±0,2	7,0±0,4	5	5,3±0,1	1,7±0,2	7±2	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
R133C	5,3±0,2	1,8±0,1	7±3	4	5,1±0,2	2,14±0,05	8±3	3	5,4±0,3	1,7±0,6	5	5,5±0,1	1,3±0,2	3
R133C L103W	5,1±0,1	2,2±0,4	6,8±0,8	3	5,23±0,09	1,7±0,2	6±2	3	5,2±0,3	0,7±0,2	4	5,50±0,04	0,78±0,07	3
R133C Y23W	5,2±0,4	2,0±0,3	9,2±0,8	3	5,1±0,2	2,50±0,07	6±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
R133C Q101W	4,81	2,26	2,71	2	4,87	2,47	4,05	1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V135C W72	5,6±0,2	1,7±0,3	7,0±0,9	4	5,29±0,08	2,0±0,1	7,2±0,7	3	6,31±0,09	1,7±0,2	7	6,05±0,02	3±1	4
D136C	5,3±0,1	1,9±0,2	7,0±0,9	4	5,29±0,04	2,0±0,3	8,3±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
D136C Q101W	5,17±0,08	2,3±0,1	8±2	3	5,4±0,2	2,2±0,3	9±3	3	5,85±0,08	0,96±0,08	4	5,8±0,1	1,3±0,6	3
D136C S93W	4,50±0,05	2,1±0,4	3±1	3	4,60±0,06	1,5±0,1	2,1±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K33C W160	5,88±0,03	1,8±0,1	9±2	3	5,6±0,2	1,8±0,4	8±2	3	6,22±0,03	2,0±0,4	4	5,95±0,07	1,25±0,09	6
K33C W160F	4,55±0,03	2,6±0,2	3,0±0,1	3	4,4±0,1	2,2±0,6	1±1	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C	5,1±0,1	1,54±0,09	7,0±1,2	3	4,8±0,2	2,3±0,4	4,3±0,8	3	5,9±0,1	1,8±0,6	4	5,5±0,3	2,2±0,6	4
P250C Y197F	5,2±0,1	1,3±0,3	4,1±0,1	5	4,73±0,09	1,2±0,2	1,5±0,9	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C Y119F	4,6±0,2	2±1	3,0±0,3	3	4,5±0,3	2,1±0,7	2,2±0,3	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C W160F	NF	NF	NF	3	NF	NF	NF	4	NA	NA	NA	NA	NA	NA
P250C Y194F	5,1±0,2	1,7±0,4	6,4±0,8	3	4,5±0,2	1,8±0,2	2±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C	5,1±0,1	1,7±0,3	8±1	4	4,7±0,2	1,7±0,3	5±4	3	4,5±0,2	2,0±0,2	4	4,8±0,1	0,9±0,3	6
E243C K33W	NF	NF	NF	4	NF	NF	NF	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C I201W	NF	NF	NF	1 0	NF	NF	NF	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C F238W	5,3±0,1	1,3±0,1	7,9±0,7s	3	4,56	1,28	4,65	2	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C L241W	5,7±0,2	0,69±0,06	5,09±0,08	3	4,8±0,1	0,61±0,03	2±1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
E243C V242W	NF	NF	NF	4	NF	NF	NF	5	NA	NA	NA	NA	NA	NA

1
2 **Supplementary Table 2:** Dose dependence of currents and fluorescence. pH₅₀ and nH of the
3 dose-response curves of currents and fluorescence, normalized to the maximum value and
4 fitted to the Hill equation. Imax values represent the maximal current recorded. NF stands for
5 not functional when maximal currents are smaller than 500nA. NA stands for non-applicable
6 and was used for mutants that did not elicit fluorescence variation bigger than 10% across the
7 range of pH tested. n represents the number of experiments. All error values were calculated
8 as standard deviations.

9
10
11

Mutant	pH	Maximal ΔF steady-state (%)	Maximal ΔF stopped-flow (%)
R133C L103W	pH6	(-) 16 \pm 1	(-) 11 \pm 3
	pH5	(-) 41 \pm 1	(-) 28 \pm 9
	pH4	(-) 50 \pm 1	(-) 35
V135C W72	pH6	(-) 25 \pm 3	(-) 20 \pm 7
	pH5	(-) 43 \pm 2	(-) 29,9 \pm 0,9
	pH4	(-) 29 \pm 3	(-) 20 \pm 3
D136C Q101W	pH6	(-) 20 \pm 4	(-) 12 \pm 3
	pH5	(-) 49 \pm 3	(-) 43 \pm 4
	pH4	(-) 53 \pm 2	(-) 45 \pm 4
K33C W160	pH6	(-) 31 \pm 4	(-) 28 \pm 5
	pH5	(-) 61 \pm 3	(-) 55 \pm 4
	pH4	(-) 64 \pm 2	(-) 56 \pm 3
P250C W160	pH6	(+) 3 \pm 7	(+) 15 \pm 8
	pH5	(+) 46 \pm 9	(+) 60 \pm 20
	pH4	(+) 50 \pm 6	(+) 70 \pm 40
E243C	pH6	(-) 2 \pm 2	(-) 13 \pm 10
	pH5	(-) 7 \pm 2	(-) 19 \pm 8
	pH4	(-) 17,0 \pm 0,8	(-) 18 \pm 9

1

2 **Supplementary Table 3:** Fluorescence variations. The two columns show the maximal
3 fluorescence variation recorded in the steady-state conditions or after 30 seconds of stopped-
4 flow recordings. (+) indicates an increase of fluorescence and (-) indicates a decrease. All
5 error values were calculated as standard deviations.

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

Mutant	pH	Dead-time (<5ms)	Exponential 1		Exponential 2		Exponential 3		n
		Relative ΔF (%)	τ1 (ms)	Relative ΔF (%)	τ2 (ms)	Relative ΔF (%)	τ3 (ms)	Relative ΔF (%)	
R133C L103W	pH6	(-) 94±6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4
	pH5	(-) 72±1	10±4	(-) 11,6±0,7	290±40	(+) 11±5	21'000±6'000	(-) 5±4	3
	pH4	(-) 72	12	(-) 15	345	(+) 6,3	9'800	(-) 7	2
V135C W72	pH6	(-) 53±9	50±40	(-) 12±4	700±400	(-) 17±6	3'000±1'000	(-) 19±4	6
	pH5	(-) 50±20	100±100	(-) 8±5	1'000±1'000	(-) 19±8	8'000±4'000	(-) 21±6	6
	pH4	(-) 82±6,0	700±400	(-) 8±2	30'000±40'000	(-) 9±6	NA	NA	4
D136C Q101W	pH6	(-) 40±30	9±4	(-) 30±10	100±10	(-) 10±10	2'900±600	(-) 14±7	4
	pH5	(-) 60±10	9±3	(-) 30±10	40±20	(-) 5±2	18'500±900	(-) 7±2	4
	pH4	(-) 86±2	11±3	(-) 12±1	4'000±5'000	1,6±0,9	NA	NA	4
K33C W160	pH6	(-) 73±9	9±5	(-) 19±9	100±100	(-) 6,1±0,7	3'000±4'000	(-) 3,2±0,6	3
	pH5	(-) 88,3±0,9	100±100	(-) 5±2	1'000±1'000	(-) 2,9±0,4	16'000±9,000	(-) 4±2	4
	pH4	(-) 90±2	100±100	(-) 2,8±0,4	2'000±2'000	(-) 3,6±0,8	10'000±2'000	(-) 4,1±0,5	3
P250C W160	pH6	(+) 90±10	300±500	(+) 10±10	NA	NA	NA	NA	4
	pH5	(+) 86±5	200±100	(+) 5±2	9'000±3'000	(+) 9±4	NA	NA	4
	pH4	(+) 70±20	100±100	(+) 6±5	6'000±5'000	(+) 20±10	NA	NA	4
E243C	pH6	(-) 80±20	8'000±10'000	(-) 8±7	12'000	(-) 20	NA	NA	4
	pH5	(-) 60±20	100±100	13±4	1'000±1'000	(+) 20±10	15'000±7'000	(-) 13±8	4
	pH4	(-) 40±20	5±1	(-) 32±9	150±20	(+) 19±7	14'000±7'000	(+) 9±5	4

1 **Supplementary Table 4:** Kinetic and fluorescence parameters of real-time measurements.

2 All the values presented in the table were extracted from multi-exponential fits of the real-
3 time measurements (see methods). The relative ΔF for each exponential fit were calculated
4 using the maximal F variation of each curve. In the case fluorescence variations were “bi-
5 directional”, the respective amplitudes of each phases were added to determine the maximal F
6 variation value. (+) indicates an increase of fluorescence and (-) indicates a decrease. All
7 error values were calculated as standard deviations.

8
9

Mutant	$d_{\text{bimane-d}_{\text{trp}} \text{pH7}} (\text{Å})$	$F/F_{\text{no quencher}} \text{pH7}$	$d_{\text{bimane-d}_{\text{trp}} \text{pH4}} (\text{Å})$	$F/F_{\text{no quencher}} \text{pH4}$
R133C S44W	14	1,01 ± 0,03	12	1,03 ± 0,04
R133C Y23W	15	0,95 ± 0,05	12	0,86 ± 0,04
R133C Q101W	13,5	0,95 ± 0,04	13	0,79 ± 0,04
R133C L103W	9,5	0,65 ± 0,02	8,5	0,31 ± 0,03
V135C W72	10	0,66 ± 0,03	10	0,40 ± 0,06
D136C S93W	9	0,34 ± 0,09	6	0,2 ± 0,1
D136C Q101W	13	0,81 ± 0,02	9,5	0,30 ± 0,04
K33C W160	17	1,02 ± 0,02	14,5	0,42 ± 0,03
E243C F238W	12	0,462 ± 0,007	11,5	0,662 ± 0,003
E243C L241W	7	0,13 ± 0,01	9	0,26 ± 0,03
P250C Y197	8	0,60 ± 0,05	11	0,93 ± 0,04

10 **Supplementary Table 5:** Variations of distances and fluorescence between pH7 and pH4.

11 The distances were measured between Cβ of the cys-mBBr position and the
12 inserted/endogenous quencher, using only subunits A and B of the GLIC_{pH7} and GLIC_{pH4}
13 structures. The fluorescence value was calculated as (F with quencher)/(F without quencher),
14 error values were calculated as standard deviations.

	V135C-Bimane
Data collection	
Resolution range (Å)	12 - 2.6 (2.692 - 2.6)
Space group	C 1 2 1
Unit cell	a=182.034 b=134.075 c=159.945 β=102.51
Total reflections	224126 (22382)
Unique reflections	113718 (11338)
Multiplicity	2.0 (2.0)
Completeness	0.98 (1.00)
Mean I/σ(I)	13.04 (1.02)
Wilson B-factor	69.01
R-merge	0.03618 (0.636)
R-meas	0.05117 (0.8994)
CC1/2	0.999 (0.836)
CC*	1 (0.954)
Refinement	
R-work	0.204
R-free	0.236
CC(work)	0.963
CC(free)	0.958
Number of non-hydrogen atoms	13647
macromolecules	12656
ligands	846
Protein residues	1555
Geometry	
RMS (bonds) (Å)	0.01
RMS (angles) (°)	1.14
Ramachandran favored (%)	96
Ramachandran allowed (%)	3.9
Ramachandran outliers (%)	0.065
Molprobity score	99th percentile
Average B-factor	
macromolecules	85.58
ligands	124.07
solvent	77.83

1

2 **Supplementary Table 6:** Data collection and refinement statistics.

Article 2

« Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels »

Ákos Nemezc*, Marie S. Prevost*, Anaïs Menny*, Pierre-Jean Corringer

Accepté pour publication à Neuron

Emerging molecular mechanisms of signal transduction in pentameric ligand-gated ion channels.

Ákos Nemezc^{(a,b)*}, Marie S. Prevost^{(c)*}, Anaïs Menny^{(a,b,d)*}, Pierre-Jean Corringer^{(a,b)#}

a Channel-Receptors Unit, Institut Pasteur, 75015 Paris, France

b CNRS UMR 3571, 75015 Paris, France

c Institute of Structural and Molecular Biology, University College London and Birkbeck, Malet Street, London WC1E 7HX, UK.

d Université Pierre et Marie Curie (UPMC), Cellule Pasteur, Paris, France

*These authors contributed equally to the manuscript

#correspondence: pjcorrin@pasteur.fr

Abstract

Nicotinic acetylcholine, serotonin type 3, γ -aminobutyric acid type A, and glycine receptors are major players of human neuronal communication. They belong to the family of pentameric ligand-gated ion channels, sharing a highly conserved modular 3D structure. Recently, high-resolution structures of both open and closed-pore conformations have been solved for a bacterial, an invertebrate, and a vertebrate receptor in this family. These data suggest that a common gating mechanism occurs, coupling neurotransmitter binding to pore opening, but they also pinpoint significant differences among subtypes. In this review, we summarize the structural and functional data in light of these gating models, and speculate about their mechanistic consequences on ion permeation, pathological mutations, as well as functional regulation by orthosteric and allosteric effectors.

Introduction

The pentameric ligand-gated ion channel (pLGIC) family, in mammals, comprises nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs), serotonin type 3 receptors (5-HT₃Rs), γ -aminobutyric acid type A receptors (GABA_ARs), glycine receptors (GlyRs), and zinc-activated ion channels. Their biological function is to bind a specific neurotransmitter, opening an intrinsic channel passively conducting ions across the membrane, which thereby triggers cell depolarization or hyperpolarization. As they are ubiquitously expressed in virtually all neurons, pLGICs contribute to all central nervous system functions, including sensory and motor processing, central autonomous control, memory and attention, sleep and wakefulness, reward, pain, anxiety, emotions, and cognition. Although their primary function is to mediate neuronal communication, pLGICs, in mammals, are involved in several physiological processes resulting from their expression in various cells types such as epithelial or immune cells (Sanders et al., 2015; Wessler and Kirkpatrick, 2008).

Numerous mutations that alter the function of pLGICs have been found to cause severe congenital pathologies (Lehmann-Horn and Jurkat-Rott, 2000) including: congenital myasthenic syndrome (a result of mutations in the muscle-type nAChR) (Sine, 2012; Steinlein, 2012), nocturnal frontal lobe epilepsy (a result of mutations in neuronal nAChRs) (Steinlein, 2012), several epileptic syndromes (a result of mutations in GABA_ARs) (Macdonald et al., 2010), hyperekplexia (a result of mutations in GlyRs) (Bode and Lynch, 2014), and autism (a result of mutations and dysfunctional regulation of several pLGICs) (Dineley et al., 2015; Pilorge et al., 2015; Vien et al., 2015). In addition, dysfunction of nAChRs and GABA_ARs has been linked to schizophrenia (Braat and Kooy, 2015; Leonard et al., 2002) and neurodegenerative pathologies such as Alzheimer's disease (James and Nordberg, 1995). pLGICs have thus been extensively studied in an effort to find therapeutic remedies to these pathologies.

pLGICs are protein complexes of 150 to 300kD, made up of five identical or homologous symmetrically arranged subunits, filling a cylinder at least 12nm in height and 7nm in diameter, and whose rotational axis coincides with the central ion pathway. The binding of an extracellular neurotransmitter stabilizes an open channel conformation through global conformational changes, while prolonged or repetitive application of neurotransmitters promotes a diminution of the response through the stabilization of a closed/desensitized state refractory to activation. In addition, intermediate states in the pathways of activation and desensitization have been identified, indicating that pLGICs can adopt a large repertoire of conformational states, which likely meet physiological needs for the regulation of neuronal activity by neurotransmitters, endogenous regulators, and lipids (Corringer et al., 2012).

pLGICs

The pLGIC superfamily from mammals to bacteria

Since the first isolation of nAChRs, more than 40 genes coding for vertebrate pLGIC subunits have been identified and grouped into distinct families, according to their neurotransmitter pharmacology (Dent, 2010): the nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs, with 17 known subunits termed α 1– α 10, β 1– β 4, γ , δ , and ϵ), the serotonin receptors type 3 (5-HT₃Rs, with 5 known subunits termed A–E), the γ -aminobutyric acid receptors type A (GABA_ARs, with 19 known subunits termed α 1– α 6, β 1– β 3, γ 1– γ 3, δ , ϵ , θ , π , and ρ 1– ρ 3), the glycine receptors (GlyRs, with 5 known subunits termed α 1– α 4 and β), and a single zinc-activated channel subunit (Figure 1). A minority of subunits can form functional homopentamers; α 7- and α 9-nAChRs (Couturier et al., 1990; Elgoyhen et al., 1994); the 5-HT_{3A} receptor (Maricq et al., 1991); α 1-, α 2-, and α 3-GlyRs (Grenningloh et al., 1990; Kuhse et al., 1990; Schmieden et al., 1989); and ρ 1-, ρ 2-, and ρ 3-GABA_ARs (Cutting et al., 1991; Kusama et al., 1993; Shingai et al., 1996). Some of these subunits can sometimes assemble with other subunits, as illustrated by α 9 α 10-nAChRs (Elgoyhen et al., 2001), 5-HT_{3AB} receptors (Davies et al., 1999), and α 1 β -GlyRs (Langosch et al., 1988). However, the majority of the subunits, predominantly for neuronal nAChRs and GABA_ARs, assemble together in obligatory heteropentamers. For example: α 2, α 3, α 4, and/or α 6 nAChR subunits assemble with β 2 and/or β 4, and optionally with α 5 or β 3; similarly, β subunits of GABA_ARs assemble with α and other complementary subunits. In contrast, the muscle nAChR displays fixed subunit stoichiometry and arrangement: α 1- γ - α 1- δ - β 1 (in adult, with the γ subunit replacing the fetal ϵ subunit (Mishina et al., 1986)). The combinatorial association of subunits thus generates a large number of receptors with different subunit compositions, stoichiometries, and functional properties. Splice variants of different pLGIC genes also add to the complexity of the pLGIC family (Beeson et al., 1990; Brüss et al., 1999; McKinley et al., 1995; Zhao et al., 2009). The rules

governing the formation of pentameric complexes are far from being fully elucidated.

pLGICs are widely found in lower organisms, such as the invertebrate *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, or *Aplysia californica* where they similarly mediate neuronal communication, and also chemotaxis (Dent, 2010). In addition to the mammalian neurotransmitters described, these invertebrate pLGICs are gated by glutamate, histamine, and protons, adding to the diversity of ligand-gated pharmacology in pLGICs (Dent, 2010). Some mollusks and annelids also naturally express a truncated version of nAChRs, termed acetylcholine binding proteins (AChBPs), which consist of the extracellular neurotransmitter binding domain of pLGICs in a membrane-free soluble form (Huang et al., 2009; Nys et al., 2013). More recently, numerous pLGICs were found in bacteria and archaea (Tasneem et al., 2004); including the proton-gated ion channel from the cyanobacteria *Gloeobacter violaceus*, termed GLIC (Bocquet et al., 2006), and a GABA/cysteamine-gated channel from *Erwinia chrysanthemi*, termed ELIC (Zimmermann and Dutzler, 2011); however, most of their physiological roles remain elusive.

pLGICs in the nervous system

The best-studied member of the mammalian pLGIC family is the muscle nAChR, which aggregates in clusters at the post-synaptic compartment near the site of pre-synaptic neurotransmitter release (del Castillo and Katz, 1955). Fast quantal (<1ms) and high concentration (>1mM) release of acetylcholine (ACh) triggers the opening of its non-specific cationic channel, letting Na^+ , K^+ , and divalent Ca^{++} ions diffuse through the membrane to depolarize the muscle fiber, thereby mediating fast synaptic "phasic" transmission (Adams et al., 1980; Katz and Miledi, 1973). In addition to the neuromuscular junction, cationic nAChRs also mediate post-synaptic transmission in the autonomic ganglia (predominantly $\alpha 3\beta 4$ - and $\alpha 3\beta 4\alpha 5$ -nAChRs (Albuquerque et al., 2009)), and possibly in the cerebral cortex ($\alpha 7$ -nAChRs (Arroyo et al., 2014)). A high permeability to calcium, notably with $\alpha 7$ -nAChR, triggers intracellular metabolic responses in addition to depolarization (Séguela et al., 1993). On the other hand, populations of neuronal nAChRs, notably the predominant $\alpha 4\beta 2$ - and $\alpha 7$ -nAChRs, are found at the level of presynaptic, axonal, dendritic, or somatic compartment of neurons, thus displaying a widespread distribution (Barrantes, 2014). The other major excitatory cationic receptors, the 5-HT₃Rs, express predominantly as the A and AB subtype in the brain and modulate the release of many neurotransmitters including dopamine, GABA, glutamate, and ACh (Miquel et al., 2002).

Prolonged, repetitive, or high-concentration neurotransmitter binding to pLGICs leads to a desensitization process which shuts the ion pathway (Katz and Thesleff, 1957; Papke et al., 2011) (Figure 1C). Desensitization may protect the neuronal or muscle fiber synapse from repetitive stimulation or pathologically high tonic concentrations of agonist, by progressively reducing the post-synaptic currents. In addition, desensitized receptors have a higher affinity for the ligand and can reactivate with ligand still bound. Thus, through the removal and subsequent return of receptor subpopulations from and to an open-state, desensitization may also shape the time course of post-synaptic currents, slowing response decay and leading to signal prolongation (Jones and Westbrook, 1996). For extra-synaptic receptors, desensitization may be even more important since prolonged application of low concentrations of agonist that diffuse from the synaptic cleft may promote desensitization without significant activation (Heidmann and Changeux, 1982; Katz and Thesleff, 1957). Whereas exogenous compounds, such as nicotine, in a narrow range of concentrations, promote receptor activation without complete desensitization (Campling et al., 2013). These properties emphasize the critical role desensitization plays in modulating receptor response.

In opposition to excitatory cationic receptors, anionic GABA_ARs mediate most of the fast inhibitory neurotransmission in the adult nervous system, with the ($\alpha 1$)₂($\beta 2$)₂ $\gamma 2$ receptor as the predominant subunit composition in the brain (Fritschy and Panzanelli, 2014), while p-containing receptors are expressed predominantly in the retina (Qian and Dowling, 1993). In comparison, GlyRs predominantly found as $\alpha 1$ and $\alpha 1\beta$ subtypes, mediate inhibitory transmission in a more restricted area, notably the brainstem, spinal cord, and substantia nigra (Baer et al., 2009).

Extra-synaptic pLGICs mediate the "tonic" regulation of network activity through their activation by low levels of ambient neurotransmitters (Betz and Laube, 2006; Brickley and Mody, 2012; Yakel, 2013), thereby modulating the release of other neurotransmitters including GABA, glutamate, and dopamine.

In addition to their respective neurotransmitters, pLGICs are modulated by a wide range of endogenous compounds. In physiological conditions, $\alpha 4\beta 2$ -nAChRs are targeted by Lynx, a GPI-anchored neurotoxin-like protein that down-regulates their

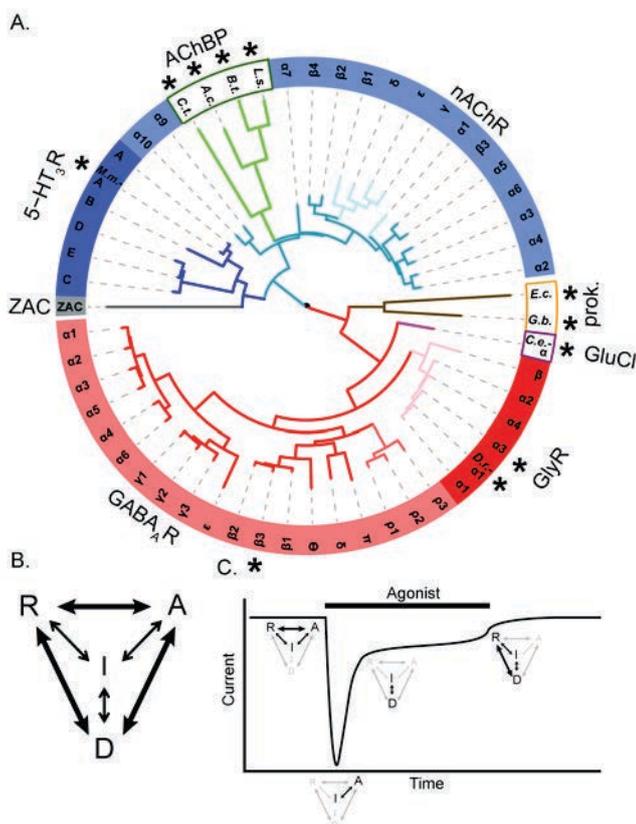


Figure 1: pLGICs. A.) Phylogeny of human pLGICs with the inclusion of non-human pLGICs (species listed) that have resolved structures, rooted to split anionic with prokaryotic (prok.) channels (bottom), and cationic channels (top). Aligned using ClustalW (Larkin et al., 2007), with the phylogeny tree generated by PhyML on phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008). Subfamilies are color coded, with mammalian anionic (GABAARs-light red and GlyRs-dark red) and cationic (nAChRs-light blue, 5-HT₃Rs-dark blue, and Zinc activated channels (ZAC)-gray) receptors in solid color, and invertebrate/prokaryotic (C.e.-GluCl α -purple, GLIC and ELIC-orange, and AChBPs-Green) homologues are outlined. Starred subunits have structures solved with selected PDB IDs as: L.s.-AChBP: agonist-1UV6, 1UW6, 2ZJU; antagonist-1YI5; B.t.-AChBP: 2BJ0; A.c.-AChBP: agonist: 2BYQ, 2WN9, 2WNJ; antagonist: 2BYR, 2BYP; C.t.-AChBP: agonist: 4AFG, 4AFH; 5-HT₃A: 4PIR; GABA α 3: 4COF; ELIC: Closed: 2VLO, 2YOE; GLIC: open: 4HFI; closed: 4NPQ; intermediates: 4NPP, 3TLT (LC1), 3TLS (LC2), 3TLV (LC3); GluCl α : open: 3RHW (ivermectin), 3RI5 (ivermectin, picrotoxin), 3RIA (ivermectin, iodide), 3RIF (ivermectin, Glutamate), closed: 4TNV, intermediate: 4TNW (POPC); GlyR α 3: 5CFB(strychnine); GlyR α 1: 3JAD (strychnine), 3JAE (glycine), 3JAF(glycine, ivermectin). B.) Simplified conformational state schema with the three primary states (Resting, Active, and Desensitized) and an I state which includes fast desensitized and other intermediate states, such as flipped and a primed state that may gate independently. The presence of multiple conformations can exist for each state. C.) Representative whole cell inward current of a pLGIC upon perfusion of an agonist (bar shows perfusion duration), with plausible state transitions detailed.

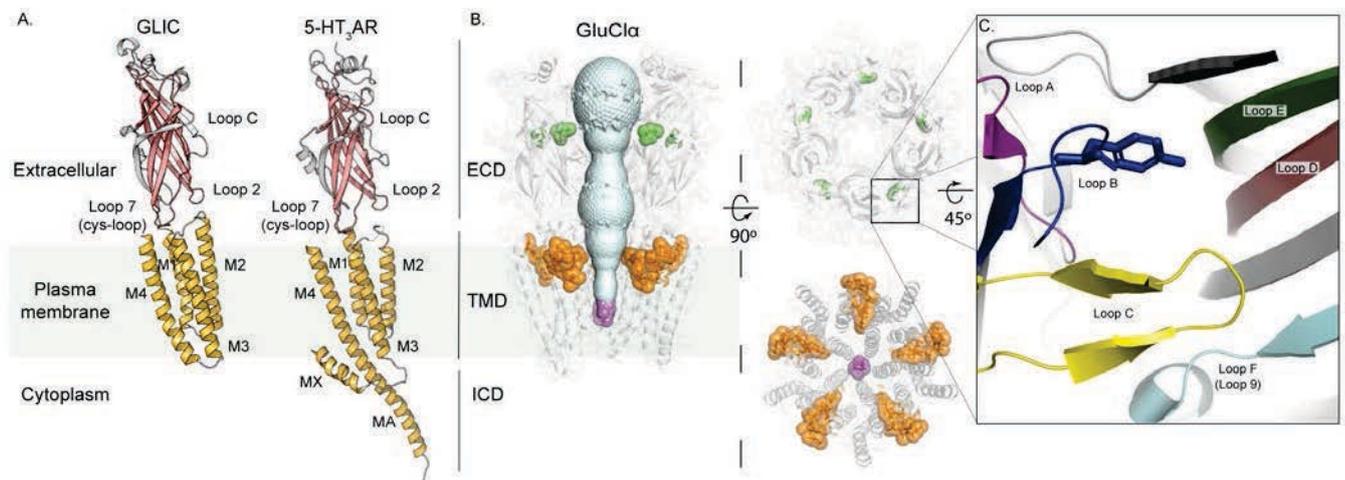


Figure 2: Basic Structure. A. Single subunit side-view representation of GLIC and 5-HT₃AR. The ECD contains the common β -sandwich fold found in the family with mammalian pLGICs including an N-terminal α -helix, important loops are labeled to give indication of location; the TMD contains four sequential α -helices (labeled M1-M4); and mammalian receptors include an ICD between M3-M4 (partially visualized in the 5-HT₃A structure), where the resolved α -helices are labeled (MA/MX). B. Side view of the homo-pentamer GluCl α (white), with the front subunit removed to show the vestibule and pore of the channel. Surface representation of accessible surface inside the channel is shown in light-cyan, using Mole2 (Berka et al., 2012). Orthosteric (glutamate: green) and allosteric ligands (ivermectin: orange; picrotoxin: magenta) resolved in GluCl α structures are also shown bound. Top-down view of ECD (top) and TMD (bottom) with ligands bound, shows pentameric form of the receptor and inter-subunit location of the orthosteric pocket, as well as the PAM and channel blocker binding sites. C. Zoom of orthosteric pocket with loops A-F (magenta, blue, yellow, pink, green, and cyan respectively) labeled and colored, with the canonical aromatic on loop B involved in ligand binding represented in stick form.

function (Miwa et al., 2011), and modulated by specific lipids such as cholesterol (Hamouda et al., 2013; daCosta et al., 2013). GABA_ARs are regulated by endozepines (Christian et al., 2013) and neurosteroids (Hosie et al., 2006), which are in large part released from glial cells, usually acting as low-concentration potentiators and high-concentration activators. pLGICs are also modulated by ions present in the synaptic cleft, such as zinc for GABA_ARs and GlyRs, and calcium for nAChRs (Galzi et al., 1996a; Laube et al., 2000; Smart et al., 1994).

pLGICs are also important targets for addictive and therapeutic drugs. A comprehensive picture of all the binding sites have been recently reviewed in several publications (Hamouda et al., 2013; Rucktooa et al., 2009; Sauguet et al., 2014b). This review does not set out to reproduce in detail the pharmacological relevance of pLGICs, but some notable highlights should be mentioned. nAChRs expressed in the ventral tegmental area have been found to be responsible for nicotine and tobacco addiction (De Biasi and Dani, 2011), and synthetic positive allosteric modulators (PAMs) targeting neuronal $\alpha 7$ -nAChRs were developed as potential neuro-protective agents and cognitive enhancers (Bertrand and Gopalakrishnan, 2007; Gill-Thind et al., 2014). GABA_ARs mediate part of ethanol's effects (Howard et al., 2011), and are the target of the benzodiazepine class of drugs, which positively modulate their function, thereby producing sedative, anxiolytic, muscle relaxant, and anticonvulsant effects (Fritschy and Panzanelli, 2014). 5-HT₃R antagonists, notably the setron class of drugs, are used for the treatment of nausea (Lumms, 2012). Additionally, pLGICs are also among the major targets for general anesthetics that include a wide range of inhalatory volatile compounds such as desflurane and chloroform, as well as injected compounds such as propofol. At clinical concentrations, they allosterically potentiate GABA_ARs, GlyRs, and 5-HT₃Rs, while they inhibit nAChRs (Forman et al., 2014; Franks, 2008; Lobo and Harris, 2005).

3D structure of pLGICs

General structure of pLGICs from X-ray crystallography

The breadth of knowledge on pLGICs was primarily built from the nAChR subfamily, with the muscle nAChR being the first member of the pLGIC family discovered (Langley, 1905), purified (Changeux et al., 1970), and observed by electron microscopy (Cartaud et al., 1973; Miyazawa et al., 1999). The first high-

resolution structure of pLGICs came from X-ray crystallography experiments performed on a soluble AChBP (Brejc et al., 2001). This structure was used in association with a near-atomic resolution cryo-electron microscopic structure of the *Torpedo marmorata* nAChR (Miyazawa et al., 1999) to study full-length pLGICs (Unwin, 2005). Subsequently, X-ray structures of full-length ancestral-type prokaryotic pLGICs, ELIC (Hilf and Dutzler, 2008a) and GLIC (Bocquet et al., 2008; Hilf and Dutzler, 2008b), were solved. ELIC and GLIC display a fully resolved structure, missing only a few amino acids at the terminals, and have among the shortest amino-acid sequence within the family. These structures show symmetrical homopentamers, with subunits consisting of an 190-200 amino-acid extracellular domain (ECD) organized in a β -sandwich fold, including inner and outer β -sheets, followed by a transmembrane domain (TMD) composed of four sequential transmembrane α -helices (M1-M4) connected by short loops (Figure 2A). The M2 α -helices of each subunit line the channel in the pentameric axis of symmetry and interact with the M1 and M3 α -helices, which in-turn interact with the M4 α -helix located at the periphery of the protein, facing the lipids (Figure 2B).

Eukaryotic pLGICs structures were subsequently solved, including: the invertebrate glutamate-gated chloride channel (GluCl α) from *Caenorhabditis elegans* (Hibbs and Gouaux, 2011), the 5-HT₃AR from *Mus musculus* (Hassaine et al., 2014), a human homomeric $\beta 3$ -GABA_AR (Miller and Aricescu, 2014), and more recently the human $\alpha 3$ -GlyR (Huang et al., 2015) as well as the $\alpha 1$ -GlyR from *Danio rerio* (zebrafish) (Du et al., 2015); the latter being solved by cryo-electron microscopy.

Since GLIC (Bocquet et al., 2006) and ELIC (Zimmermann and Dutzler, 2011) are functional pLGICs, their structures likely represent the minimal common core required for chemo-electric conversion. This common core is highly conserved in all pLGICs whose structures have currently been solved. However, the eukaryotic pLGICs bear extra motifs: 1) an N-terminal α -helix that varies in length between subtypes and lies on the top of the ECD; 2) an intracellular domain (ICD) that greatly varies in sequence and length (80-200 residues) between subtypes, and connects the M3 α -helix to the M4 α -helix; 3) post-translational modifications, including N-linked glycosylations, some of which are resolved in the AChBP, 5-HT₃AR, $\beta 3$ -GABA_AR, $\alpha 1$ -GlyR, and $\alpha 3$ -GlyR structures; and 4) an ultra-conserved disulfide-bridge in loop 7, that names the eukaryotic pLGIC Cys-loop receptor subfamily (Figure 2A). In most structures, the ICD was removed and replaced

by a short linker, with the exception of the 5-HT₃AR. A large portion of the 5-HT₃AR-ICD was digested by trypsin, and what remained after digestion is partially resolved in the form of two α -helices, one connected to the M3 α -helix and oriented parallel to the plane of the membrane, and one extending from the M4 α -helix toward the cytoplasmic side (Hassaine et al., 2014) (Figure 2A). This latter M4 α -helix configuration is also seen in the electron microscopy map of the muscle nAChR (Miyazawa et al., 1999).

Modular functional architecture of pLGICs

The pLGIC structure is thus characterized by abrupt secondary/tertiary structural changes at the ECD-TMD and TMD-ICD interfaces, highlighting a clear-cut modular architecture.

The ECD carries the binding site for the endogenous neurotransmitter, which is called the orthosteric site according to IUBCP nomenclature (Christopoulos et al., 2014). It is topologically conserved in the family, and is located at the subunit interface, halfway between the ECD apex and the membrane (Figure 2B). Numerous complexes between pLGICs and orthosteric ligands were solved by X-ray crystallography: ELIC with GABA (Spurny et al., 2012); GluCl α with glutamate (Hibbs and Gouaux, 2011); β 3-GABA_AR with benzamidine (Miller and Aricescu, 2014); α 1- and α 3-GlyR with strychnine (Du et al., 2015; Huang et al., 2015); AChBPs with carbamylcholine, nicotine, and a large series of other agonists and antagonists (Billen et al., 2012; Bourne et al., 2010; Rucktooa et al., 2009); and AChBP/ α 7 or /5-HT₃A chimeras in complex with nicotinic and serotonergic ligands (Huang et al., 2013; Kesters et al., 2012; Nemezc and Taylor, 2011). These structures show an overall common mode of binding at the orthosteric site.

All neurotransmitters carry a positively charged ammonium group, which is a key pharmacophore, and they bind to the principal subunit of the orthosteric interface (Corringer et al., 2012). Three loops, termed A, B, and C, contribute to a nest of aromatic residues, stabilizing the ammonium through cation- π interactions (Xiu et al., 2009) and/or hydrogen bonding (Hansen et al., 2005), with loop B playing a principal role and loop C "capping" the ligand within the interface (Taylor et al., 2007) (Figure 2C). The complementary subunit interface is composed of loops D, E, and F; although loops D and E were in fact later found to be β -sheets (Figure 2C). More variable interactions occur on the complementary side, depending on the ligand and the pLGIC subtype.

The ECD and TMD, covalently linked through the pre-M1 (C-terminal of the ECD) and the M1 α -helix, form an interface through several well-conserved loops: loop 2 (β 1- β 2 loop) above the top of M2 and the N-terminal portion of the M2-M3 loop; loop 7 (β 6- β 7 loop, Cys-loop) carrying a canonical Φ P Φ D motif, contacts the top of the entire TMD; loop 9 (β 8- β 9 loop, loop F) above the M2-M3 loop from the adjacent subunit; and the TMD M2-M3 hairpin loop itself, at the subunit interface, which additionally interacts with the pre-M1 region from the adjacent subunit (Figure 2). Mutational studies have previously established the key role of these interface motifs in coupling agonist binding to channel opening (reviewed in (Bouzat, 2011; Thompson et al., 2010)).

Interestingly, some isolated ECDs were shown to fold correctly and even self-assemble. Isolated ECDs of GLIC (Nury et al., 2009), α 1-nAChR (Dellisanti et al., 2007), and α 9-nAChR (Zouridakis et al., 2014) express as soluble monomers and retain a native-like β -sandwich fold in their crystallographic structures. An exception to this observation is the AChBPs, which are naturally truncated from the TMDs and organize as a soluble pentamer, a property probably selected by evolution to allow AChBPs to retain high ACh binding affinity.

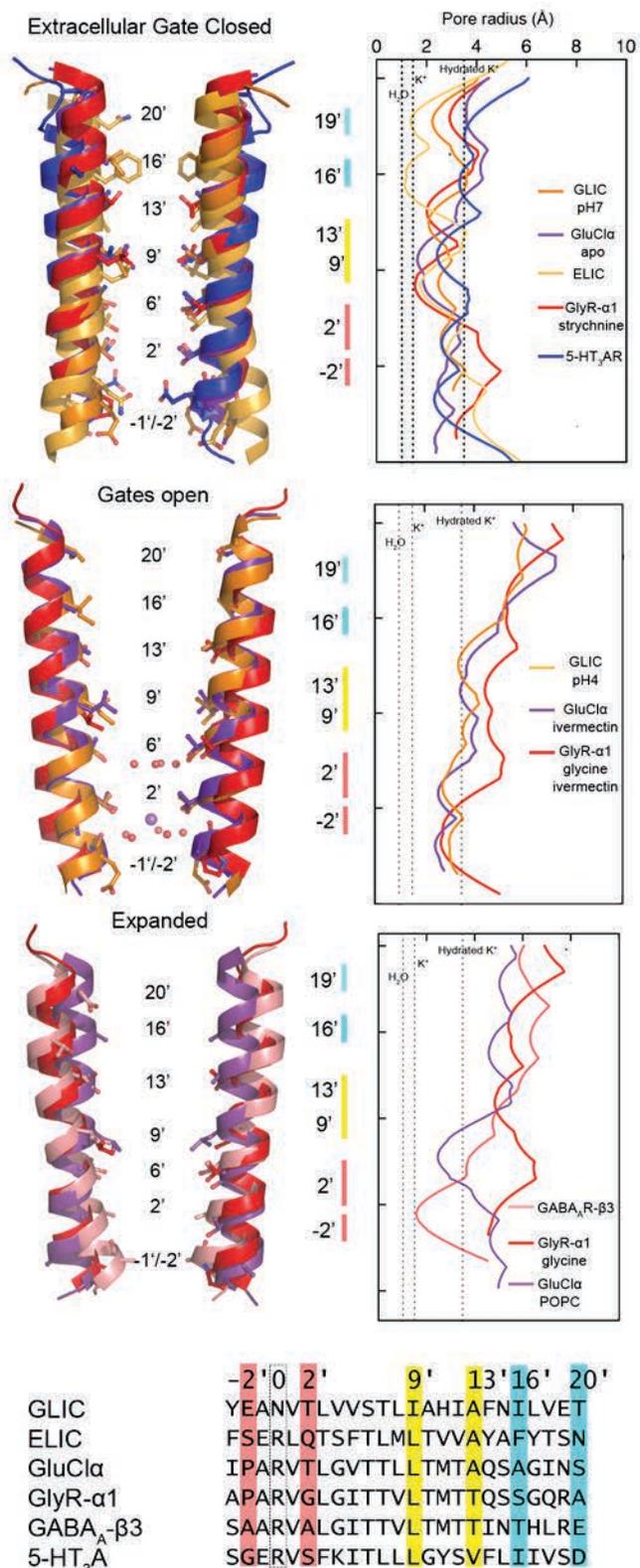


Figure 3: Pore radii. Channel states represented by two M2 α -helices (prime numbering of residues) from opposite facing subunits with pore radii, calculated using Hole (Smart et al., 1993), shown to the right. The radii of H₂O, K⁺, and hydrated-K⁺ are shown as dashed lines. Top: Closed/Resting states from GLIC, GluCl α , ELIC, GlyR- α 1, and 5-HT₃AR; Middle: Open/Active states from GLIC, GluCl α , and GlyR- α 1; Bottom: Expanded/Desensitized states from GABA β 3, GlyR- α 1, and GluCl α . Receptor subunits are color-coded with pore radii traces. A sequence alignment of the M2 α -helices is found underneath.

Embedded in the plasma membrane, the TMD carries the ion channel that coincides with the pentameric axis of symmetry at the center of the helix bundle (Giraudat et al., 1986). To access the channel, ions pass through the wide vestibule from the ECD (Hansen et al., 2008) (Figure 2B). The ion channel is bordered by

the M2 α -helices of each subunit, generating a stratified organization where pentagonal rings of generally homologous residues align along the z axis. For the family of pLGICs the 20' ring generally consists of polar residues (Asp, Asn, Glu, Gln, His, and Lys), with the exception of Ala in GlyRs. Next, two rings of generally hydrophobic residues follow for cationic pLGICs, with the inclusion of Ser/Thr residues for anionic pLGICs at positions 16' and 13'. Then a highly conserved Leu ring is present at 9', with the exception of GLIC (Ile) and nAChR accessory $\alpha 5/\beta 3$ subunits (Val). This ring is followed by, most commonly, a Thr or Ser ring at 6'. Lastly, a variable ring occurs at the 2' position. Within the M1-M2 loop, cationic receptors usually contain a Glu at -1', with the exception of GLIC where Glu is at -2'; whereas anionic receptors contain an Ala at -1' and contain an additional residue at -2', usually Pro or Ala (Figure 3). Mutation of this M1-2 loop was found to govern ion permeation, according to charge, thereby supporting its role as a selectivity filter of the channel (Corringer et al., 1999). The TMD establishes many lipid contacts, primarily with the peripheral M4 α -helix, but also with the M1 and M3 α -helices. Interestingly, the TMDs of $\alpha 4\beta 2$ -nAChR, $\alpha 7$ -nAChR, and $\alpha 1$ -GlyR were expressed alone and studied by a combination of electron microscopy, nuclear magnetic resonance, and multi-angle light scattering, revealing bundles of four helices spontaneously interacting together to mainly form pentameric rosettes (Mowrey et al., 2014). These experiments indicate a major role of the TMD for oligomerization.

Facing the cytoplasm, the ICD plays a major role in aggregating and targeting receptors in muscle and neurons, notably through direct interaction with rapsyn (Zuber and Unwin, 2013) (muscle nAChR) and gephyrin (Fritschy et al., 2008) (GABA_ARs and GlyRs). It is also involved in the regulation of pLGIC response by phosphorylation (Han et al., 2013), and allosteric modulation through its interaction with the G_{βγ} protein (Yevenes et al., 2003). To exit the ion channel pore, ions pass through lateral "windows" within the ICD (Carland et al., 2013; Kelley et al., 2003; Song and Corry, 2009). Altering or removing the ICD has dramatic consequences in phenotype (Tsetlin et al., 2011). Chimeric receptors containing various ICDs also showed an altered assembly, regulation, and functional conductance of pLGICs (Kracun et al., 2008). Yet a common practice for enhancing structural resolution has been to remove the ICD, and this does not definitively perturb protein expression.

Genetic engineering showed that the ECD agonist-binding module and the TMD/ICD-pore module from different receptors subtypes can be combined with minimal ECD/TMD interface mutations to form functional chimeras; such as the $\alpha 7$ -nAChR(ECD)/5-HT₃AR(TMD+ICD) (Eiselé et al., 1993), $\alpha 7$ -nAChR(ECD)/ $\alpha 1$ -GlyR(TMD+ICD) (Grutter et al., 2005), ELIC(ECD)/GLIC(TMD) (Schmandt et al., 2015), and even bacterial-human GLIC(ECD)/ $\alpha 1$ -GlyR(TMD) (Duret et al., 2011) and ELIC(ECD)/ $\alpha 7$ -nAChR(TMD) (Tillman et al., 2014). The GLIC(ECD)/ $\alpha 1$ -GlyR(TMD) and ELIC(ECD)/GLIC(TMD) chimeras were recently solved using X-ray crystallography, showing a high conservation of the common core and of the ECD-TMD interface, even between bacterial and human receptors, that accounts for the compatibility of the two domains to form a functional pLGIC (Moraga-Cid et al., 2015; Schmandt et al., 2015). It was additionally shown that chimeras of GLIC bearing the ICD from the 5-HT₃AR, $\alpha 7$ -nAChR, $\alpha 1$ -GlyR, or $\rho 1$ -GABA_AR do not significantly deviate in function from GLIC (Goyal et al., 2011; Mnatsakanyan et al., 2015).

Conformational transitions of activation

The two-state MWC model for activation.

Early electrophysiological experiments on the muscle nAChR showed that acetylcholine application promotes fast activation (<1ms), i.e. channel opening (Katz and Miledi, 1965). Two models

were proposed to account for the agonist-elicited activation: 1) the induced-fit theory which postulates that substrate binding is a pre-requisite for activation and drives conformational change (Koshland, 1959); and 2) the Monod-Wyman-Changeux (MWC) theory, initially proposed to model the behavior of allosteric enzymes, which postulates that pLGICs spontaneously isomerize between pre-existing states, whereby ligands shift equilibria toward the states for which they display the highest binding affinity (Monod et al., 1965). The MWC theory also postulates that the transitions between states preserve the molecular symmetry of the oligomers, implying a concerted reorganization of every subunit. Thus, two symmetrical states, an active high-ligand-affinity and a resting low-affinity state, are part of an equilibrium that is incrementally shifted upon each subsequent ligand binding toward the higher affinity active-state, thereby explaining the observable cooperativity of ligand binding and ligand-elicited activation.

Since the development of patch-clamp electrophysiology, single channel recordings have provided unprecedented kinetic information about gating. Single channel recordings showed that at low agonist concentrations groups of openings are divided into bursts, separated by channel closing due to agonist dissociation (Colquhoun and Sakmann, 1998); whereas at high agonist concentrations, these bursts are delimited by desensitized intervals (Auerbach, 2012; Katz and Thesleff, 1957). Extensive work on the muscle nAChR demonstrates a good fit of the MWC theory to two states of the receptor's behavior, resting (R) and active (A) (Auerbach, 2012). This R/A model quantitatively describes the activation of the un-, mono-, and di-liganded forms. The spontaneously open unliganded isomerization constant, in the absence of ACh, was measured for gain of function mutants, allowing extrapolation to the wild-type which opens for an average of ~80 μ s at a frequency of about once every 15 min (Purohit and Auerbach, 2008).

Resting-like and Active-like conformations observed by X-ray crystallography

Resting-like conformations

The MWC model thus postulates the existence of an R state carrying a closed channel and low agonist affinity, and an A state with an open channel and a higher agonist affinity. As stated above, several atomic structures of pLGICs have been solved by X-ray crystallography and electron cryo-microscopy. In these experiments, the proteins are extracted from the lipid bilayer, solubilized and purified in detergent, and in the case of crystallography, engage in multiple protein-protein interactions in the asymmetrical crystallographic unit. Despite these non-physiologically relevant conditions, a common depiction of the activation mechanism is emerging from these structures and previous molecular dynamics simulations (Calimet et al., 2013; Cecchini and Changeux, 2014; Sauguet et al., 2014a).

GLIC has been resolved at an activating proton concentration (pH 4), and one that elicits no activation (pH 7) (Bocquet et al., 2008; Hilf and Dutzler, 2008b; Sauguet et al., 2014a). The binding site(s) for proton activation has yet to be identified, but it is predominantly thought to reside within the ECD (Duret et al., 2011; Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2013a), although the TMD has also been suggested to play a role (Cheng and Sine, 2011; Rienzo et al., 2014). In parallel, the GluCl_a construct, not actually activated by glutamate but by ivermectin binding to its TMD, was solved in the presence and absence of ivermectin (Althoff et al., 2014; Hibbs and Gouaux, 2011). Finally, the $\alpha 1$ - and $\alpha 3$ -GlyRs were solved in complexes with the competitive antagonist strychnine, and the $\alpha 1$ -GlyR in the presence of glycine (Du et al., 2015; Huang et al., 2015).

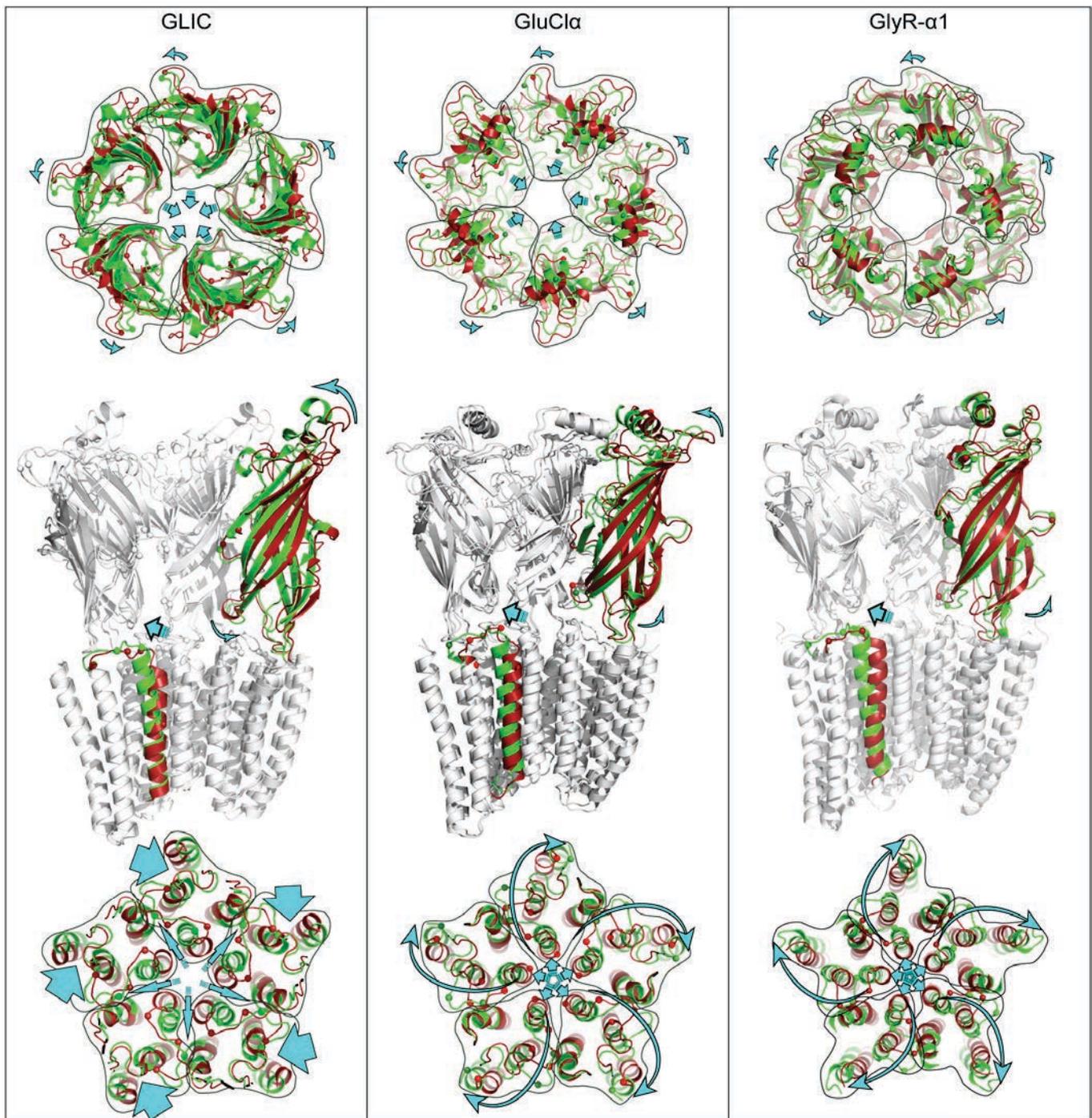


Figure 4: pLGIC transitions. Red: resting-like state conformation; Green: active-like state conformation. In each panel the top down view of the ECD (top) and TMD (bottom) are shown, along with a three subunit side-view of the full receptor (middle). All structures were aligned using the whole pentamer. Left panel: GLIC transitions (pH7->pH4); Middle panel: GluCl α transitions (apo->ivermectin-bound); Right panel: GlyR- α 1 transitions (strychnine->glycine/ivermectin-bound). Arrows indicate gate-opening transition motions, with curved arrows representing twisting motions and broad arrows translations/tilts.

The GLIC-pH7 and GluCl α -apo structures display a closed channel and represent the pharmacological un-liganded resting-state, whereas the α 1- and α 3-GlyRs with strychnine bound represent an antagonist-bound resting-state. In all structures, pore side-chains point toward the central axis to form at least one hydrophobic constriction. GLIC has a constriction at the level of Ile9' (1.7 Å radius) and Ile16' (2 Å radius), whereas GluCl α constricts at Leu9' (1.5 Å radius). The α 1-/ α 3-GlyR structures show the constriction point at Leu9' (1.4 Å radius) with the addition of Thr13' and Ser/Ala20' (~2-3 Å radius) (Figure 3). These geometries clearly point to non-conductive conformations, since the unfavorable interactions between these hydrophobic "nanopores" and water lead to a stochastic liquid-vapor transition, "dewetting" the pore and

generating an impassable energy barrier to ion conduction (Aryal et al., 2014).

The structure of ELIC (Hilf and Dutzler, 2008a) also shows a closed channel with a hydrophobic constriction at the 9' and 16' positions (Figure 3), but this conformation is observed both in the presence of a bound antagonist (ACh (Pan et al., 2012)) or agonist (GABA (Spurny et al., 2012)). An ELIC(ECD)/GLIC(TMD) chimera also shows a closed channel with a TMD nearly identical to GLIC-pH7, whereas the ECD has a synonymous conformation to the other ELIC structures previously determined (Schmandt et al., 2015).

The 5-HT₃AR structure equally shows a unique arrangement of the TMD with a particular rotamer of Ile9' side-chain in the channel, yet this only generates a local constriction of a 2.5 Å radius (Figure 3) (Hassaine et al., 2014). Assignment of these conformations to a physiological state has remained elusive thus far.

Active-like conformations

GLIC-pH4, GluCl α -ivermectin(/glutamate /picrotoxin /iodide), and α 1-GlyR-glycine(/ivermectin) structures show a large opening of the constrictions seen in the closed-channel structures. The constriction of the pore (2-2.5 Å radius) in all cases shifts to the intracellular side, between the -2' and 2' positions (Figure 3). This pore geometry is consistent with a wealth of biochemical data collected on the open state, from measurements of cysteine accessibility, lysine scanning mutagenesis, and other mutagenesis studies which support the conclusion that -2' to 2' channel constriction constitutes the selectivity filter of the pore, screening permeant ions according to their charge (Corringar et al., 1999; Cymes et al., 2005; Galzi et al., 1992; Keramidas et al., 2004; Wilson and Karlin, 1998).

A high-resolution (2.4 Å) GLIC-pH4 structure allowed the identification of two ordered water pentagons within the pore, near the 2' and 6' positions, with one sodium ion between them. These data were used as a template to perform molecular dynamics simulations where a cation was pulled through the pore (Sauguet et al., 2013b). In the hydrophobic upper-half of the pore, the sodium ions remain highly hydrated by two layers of water molecules, which cover the surface of the pore and interact with the carbonyl oxygens of the main chain. Once the ions pass to the lower half of the pore, the distribution of water molecules becomes strongly anisotropic, with transient interactions between the permeant ion and the side-chain hydroxyl/carboxylate moieties of Ser6', Thr2', and Glu-2' residues. Glu-2' alternates between an upward and a downward conformation, thereby escorting the diffusing ion at the pore exit. A similar mechanism has been proposed for the muscle nAChR which bears a ring of glutamates at the -1' position, therefore one can assume cationic ion permeation functions in this manner (Cheng et al., 2008; Cymes and Grosman, 2012). Electrostatic calculations on both GLIC-pH4 and GluCl α -ivermectin indicate that the upper half of both channels may conduct cations and anions equally well, although this was shown to depend on the side-chain orientation of Ser/Thr6' (Sauguet et al., 2013b). In contrast, the lower part of the channel is strongly electronegative for GLIC and electropositive for GluCl α , contributing to their opposite charge selectivity. Calculations on the 5-HT₃AR corroborate the idea that ions experience the same hydrophobic environment in the upper half of the pore, whereas the potential force increases significantly for anions in the lower half of the pore (Di Maio et al., 2015). The overall data point to the existence of a hydrophobic "activation gate" near the 9' position, although the conductance of certain "active-like" structures, such as that of the α 1-GlyR-glycine/ivermectin, has been debated (Du et al., 2015).

It is noteworthy that, with regard to the TMD, the conformation of ivermectin-bound GluCl α and α 1-GlyR, along with GLIC-pH4 are highly similar. However, the α 1-GlyR-glycine shows a local expansion of the cytoplasmic side of the pore as compared with α 1-GlyR-glycine/ivermectin-bound form (from a radius of 3 to 4.4 Å) (Figure 3). This conformation was proposed to represent the fully open conformation of the GlyR (Du et al., 2015), raising the idea that the ivermectin-bound structures might actually represent a closed, possibly desensitized conformation. However, the α 1-GlyR is known to fluctuate between different sub-conducting states from single-channel experiments (Bormann et al., 1994), and the observed radius of the α 1-GlyR-glycine pore is larger than that evaluated from a pattern of permeation with ions of increasing size (2.65 Å) (Rundström et al., 1994). Future work is needed to

investigate the conformational fluctuation at the cytoplasmic border of the TMD, notably in the presence of the intracellular domain that might apply additional structural constraints.

Activation transition deduced from X-ray structures

The GLIC transition:

Superimposing the GLIC-pH7 and GLIC-pH4 structures reveals the global reorganizations associated with the activation gate opening that is stabilized by protons (Figure 4). At the ECD, GLIC-pH7 is characterized by an extended conformation where the subunits are loosely packed, with relatively few interactions, generating large solvent-accessible surfaces at the ECD-ECD interfaces as well as quaternary flexibility. Transition from the pH7 to the pH4 form can be approximated by a rigid-body movement of each subunit's β -sandwich, leading to a more compact arrangement with an 180Å² increase in surface-contact at the subunit interfaces (Sauguet et al., 2014a). The β -sandwiches move radially toward the central pentameric axis of symmetry, resembling the "un-blooming" of a flower, and also tangentially in a global anti-clockwise twist of the whole ECD (Figure 4, Figure 5C). Loop C shows an overall tertiary motion, where the body of the loop rotates to close up on the orthosteric pocket, while the tip of the loop follows the quaternary shift of the complementary subunit (Figure 5C).

Interestingly, both the twisting and un-blooming motions were predicted using normal mode analysis on other pGLICs (Bertaccini et al., 2008; Taly et al., 2005).

In the TMD, the M3 and M4 α -helices are almost immobile (when performing a local TMD alignment of the pentamers), while the upper parts of the M2 and M1 α -helices undergo a tilting motion of respectively 17° and 10°. Both α -helices bend near the middle of the TMD, at 9' for the M2 α -helix and Pro204 for the M1 α -helix. In the process, the M2 α -helix approaches the M3 α -helix from the same subunit and the M1 α -helix from the adjacent subunit (Figure 4). Consequently, the bundle of M2 α -helices undergoes a concerted anticlockwise twist, according to an iris-like motion, while both Ile9' and Ile16' side chains move away from the pore and toward the helix interface to open the gate. Interestingly, mutations of the hydrophobic residues into more polar residues, in all pGLICs, produce marked gain of function phenotypes stabilizing the active-state as compared to the resting-state, confirming their involvement in channel gating (Chang and Weiss, 1999; Labarca et al., 1995; Revah et al., 1991; Yakel et al., 1993). In addition, a systematic survey of mutations performed on the muscle nAChR, analyzed by single channel recordings (Purohit et al., 2013), are also in agreement with the hypothesis that activation requires the opening of the activation-gate hydrophobic block.

At the ECD-TMD interface of GLIC, among the more subtle motions of the ECD-interacting loops, the M2-M3 loop undergoes a pronounced lateral revolving motion around the M3 α -helix, which produces a 4 Å shift of the loop away from the pentameric axis (Figure 4). This movement generates a redistribution of many side-chain interactions with neighboring motifs, such as the well-conserved Leu22', which moves from a downward binding mode, where it interacts with the TMD, to an upward binding mode, where it interacts with residues of loop 7 (Phe116 and Tyr119). In addition, the canonical Pro23' passes beneath Lys33, which lies at the tip of loop 2, and plausibly contributes to the stabilization of the loop in the open form conformation. From the structure-inferred transitions, it appears clear that the M2-M3 loop is a key element in allosterically coupling the orthosteric ligand-pocket of the ECD and the activation-gate of the TMD.

The GluCl α transition:

The transition inferred from the two GluCl α structures shows important similarities with that of GLIC (Figure 4). At the ECD, the subunit β -sandwiches display essentially the same un-blooming and twisting motions, although with smaller amplitudes at the apical extremity. As with GLIC, this leads to a narrowing of the subunit interface that holds the orthosteric site for glutamate. Loops A, B, and C move in quasi rigid-body motion to come closer to the complementary subunit, and the global ECD un-blooming motion produces a shift of the complementary subunit inner β -sheet towards the central axis of symmetry (Figure 4, Figure 5B). During this transition Arg123 rotates from an upward to a downward conformation, emptying the orthosteric pocket and allowing the binding of glutamate (Figure 5B). In the GluCl α active-like structure, bound glutamate elicits cation- π interactions with Tyr151 (loop B), and is in close proximity to Phe91 (loop A) and Tyr200 (loop C) from the principal subunit, while hydrogen bonding with Arg37, Arg56, and Ser121 from the complementary subunit (Figure 5A). This binding is reinforced through Arg37 hydrogen bonding with Lys171, on loop F, which rotates from a downward to an upward conformation in the active-like structure (Figure 5B). Altogether, the compact organization of the binding site in the active state is consistent with an increase binding affinity, which is a key feature of the MWC model.

At the TMD level, the GluCl α transition is associated with a global reorganization of the TMD, rotating anti-clockwise by 10 $^\circ$ around each subunit's M1 α -helix, which contrasts with the local motion of the M1 and M2 α -helices seen in the GLIC activation model (Figure 4). In the process, the M2-M3 loop moves 4-5 Å out of the pore in a horizontal motion, with Pro23' passing beneath loop 2 as seen in GLIC (Althoff et al., 2014; Calimet et al., 2013). In contrast to the iris-like motion seen in GLIC, the M2 α -helices tilt in a radial direction, and the TMD twisting leads to the opening of a gap between the M3 α -helix and the M1 α -helix of the adjacent subunit to accommodate ivermectin binding (Figure 6A).

The α 1-GlyR transitions

According to the MWC theory, all states are in equilibrium with each other. Although the α 1-GlyR was not solved in an apo-state, it is pertinent to describe the transition between the strychnine-bound and glycine/ivermectin-bound form, even if the probability of such a transition at the physiological level remains unclear. In the basal portion of the ECD, the GlyR-strychnine bound structures are nearly synonymous with that of GluCl α -apo, and therefore the transition is similar to that of GluCl α (Figure 4). In contrast, the GlyR-strychnine bound structures are already "un-bloomed" in the apical portion of the ECD, resembling the α 1-GlyR-glycine bound conformation. Additionally, loop C undergoes a major tertiary movement, not seen in the GluCl α transition (Figure 5B, D). Therefore, the overall activation transition can no longer be described as an "un-blooming" motion of the ECD, rather the apical half maintains only a subtle "un-blooming" action, whereas the ECD-TMD interface resembles that of a diaphragm shutter opening.

At the level of the TMD, the GlyR-strychnine and GluCl α -apo conformations are commensurate at the level of the backbone α -carbon chain, as are the α 1-GlyR-ivermectin-bound and GluCl α -ivermectin-bound structures (Figure 6A). However, the two strychnine-bound structures differ at the level of the M1-M2 linker. The α 3-GlyR X-ray crystal structure has a radial twist in comparison to the α 1-GlyR-strychnine, which aligns well with the GluCl α -apo structure in this region. The movement of the TMD is therefore similar to the tilt transition and rotation of the α -helix bundle around the M1 α -helix of GluCl α (Figure 4). Interestingly the idea that an antagonist-bound conformation differs from an apo-conformation only in the ECD is suggested by voltage-clamp fluorometry experiments showing that strychnine produces

conformational motions of the ECD without opening the pore (Pless and Lynch, 2009).

Orthosteric site transition:

Previous work on AChBPs described a closed (capped) vs. open (uncapped) conformation of loop C for agonists' vs. most antagonists' binding, respectively, with the suggestion that the capping movement might contribute to activation (Taylor et al., 2007; Toghraee et al., 2009). AChBPs display weak quaternary flexibility in comparison to pLGICs (Nemecz and Taylor, 2011), therefore only tertiary movements were observed. The α 1-GlyR (antagonist-agonist) loop C movement is analogous to that seen in AChBPs, whereas the GLIC (apo-open) movement is markedly different, and GluCl α shows no tertiary change. These differences could be a result of the fact that, in GLIC, proton interaction does not overlap with loop C (Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2013a), and the possible influence from the Fab fragment used for crystallization in GluCl α . Although, a tertiary "capping" movement of loop C might contribute, for instance, to the priming of particular interfaces before the global reorganization, it is most likely that quaternary reorganizations, seen in all cases, are key in the agonist-stabilized activation mechanism.

In light of the orthosteric site rearrangements seen in X-ray structures, one can speculate about the sequence of events occurring during agonist-elicited activation. The GluCl α -ivermectin active-like structures show a near-identical conformation at the orthosteric site regardless of the binding of glutamate. Consistent with a conformational selection mechanism in physiological conditions, the receptor would spontaneously isomerize toward the active-like conformation, followed by high affinity binding to glutamate, providing energetic stabilization and displacing the allosteric equilibrium toward the active state. The resting state of pLGICs is also expected to bind to orthosteric agonists, although with lower affinity than the active state, thus, at high agonist concentrations that are typical of synaptic transmission, neurotransmitter binding probably occurs to the resting state of the pLGIC, which then quickly transitions to the active conformation (Sine, 2012).

Interestingly structures of the α 1- and α 9-nAChR subunit's ECDs show that ligands can bind to monomeric subunits carrying the principal component of binding (Dellisanti et al., 2007; Zouridakis et al., 2014). One could therefore speculate that, in the resting-state, low-affinity binding is primarily mediated by the principal component, and agonist binding favors the un-blooming motion which increases affinity for subsequent agonists, as seen by the property of ligand-binding cooperativity in pLGICs, thereby further stabilizing an ECD conformation that triggers activation.

Comparison of the GLIC, GluCl α , and α 1-GlyR mechanisms:

Altogether, a common gating mechanism is observed for GLIC, GluCl α , and α 1-GlyR, where the M2-M3 loop acts as a key-coupling element. It interacts with the bottom of the ECD interface, and undergoes a large outward translation that is concerted with gate opening (Figure 4). Agonist binding stabilizes a quaternary twisting/un-blooming reorganization of the ECD triggering channel activation; meanwhile small antagonists possibly partially-block the "un-blooming" motion and thereby lock a distinct non-conducting state. Yet, significant structural differences are observed between subtypes, notably at the TMD. The GLIC-pH7 and GluCl α -apo structures show different conformations, either due to species differences or to the occurrence of several resting conformations. We have attempted to classify these structures according to the early three-state (resting-active-desensitized) MWC model, yet this classification suggests that multiple related sub-states are necessary in order to properly depict each state. This was

anticipated from single channel experiments and from earlier theoretical work (Galzi et al., 1996b).

Transition pathway of deactivation explored by molecular dynamic simulation

Molecular dynamics simulations in a fully-solvated explicit-membrane environment were performed to model the de-activation pathways starting from the open forms of GLIC and GluCl α . In a first study, the GLIC-pH4 structure was set up instantaneously at pH7, and submitted to a 1 μ s simulation (Nury et al., 2010). The simulation shows an asymmetric channel closure that rapidly takes place at the level of the activation gate followed by a progressively increasing quaternary twist. In the GluCl α , a similar procedure was used by instantaneously removing bound ivermectin. This time, the analysis shows a rapid global structural change to a partially twisted conformation, followed by a loss of hydrogen-bonding contacts of glutamate and by the movement of the M2-M3 loop toward the central axis (Calimet et al., 2013). These different mechanisms thus point out the complexity of unraveling the molecular events underlying the transition of pLGICs. Future molecular dynamics simulations starting from the recently-solved resting conformations will undoubtedly give new insights into this complexity.

Other states in the conformational pathway

States in the activation pathway inferred from kinetic models

Activation of pLGICs involves a cascade of structural events that occur in the μ s to ms time scale (Chakrapani and Auerbach, 2004).

The transition-state of the activation pathway was studied using rate-equilibrium free-energy relationships (REFER) on the muscle nAChR. A mapping of the energetic destabilization of the transition-state versus native-state that results from introduced mutations suggests that both the orthosteric binding-site and the M2-M3 loop (specifically residues Ile18', Pro23', and Ser26') move first during the transition, followed by the rest of the ECD, and then the TMD (Purohit et al., 2013). Measurements for a nAChR engineered to gate constitutively also suggest that the conformational pathway of activation is fundamentally the same with and without agonist (Purohit and Auerbach, 2008), agreeing with MWC. However, some theoretical questions have been raised concerning these analyses (Edelstein and Changeux, 2010).

Investigations of short-lived electrophysiological events also revealed the presence of intermediate states during activation, implying an early transition of the receptor toward a higher-affinity conformation of the orthosteric site, followed by a late transition involving channel opening. For both the muscle nAChR and the α 1-GlyR, a "flip" F state was proposed to intervene during gating, where a "flipped" symmetrical conformation is stabilized by agonist binding (Lape et al., 2008; Sivilotti, 2009). Entry into the flip state is then followed by channel opening, independent of the intrinsic efficacy of agonists (Lape et al., 2008). In parallel, kinetics modeling of the muscle nAChR showed that incorporation of a brief extra state improves the statistical fit of the data, and thereby suggests the occurrence of multiple functionally pre-activated or "primed" states together with multiple open sub-states (Mukhtasimova et al., 2009; Sine, 2012). Studies on other pLGICs have even required a refined flip/priming model in order to account for the functional data (Krashia et al., 2011; Marabelli et al., 2014). Interestingly, the prime model, developed on the heteromeric muscle nAChR, has been suggested to involve asymmetric transitions, thereby departing from one of the MWC's initial postulates.

Asymmetry is also supported through the importance of the principal subunit in the functional effect of agonist-elicited activation. Examining the maximum change in isomerization constant between conducting and non-conducting states, following mutations in the muscle nAChR and GlyR, shows a marked effect in the α subunit as compared to the β , and other complementary/accessory subunits (Purohit et al., 2013; Shan et al., 2003). Altogether, these observations therefore require an extension of the MWC model.

The locally-closed conformation

Among pLGICs, GLIC has been the most extensively characterized by X-ray crystallography, revealing conformational features that might be relevant to the conformational pathway of activation. Interestingly, in the GLIC-pH7 crystal, a large structural variability is observed between the ECDs of the four pentamers seen in the asymmetric unit, highlighting large intrinsic quaternary/tertiary fluctuations in this state. These fluctuations are thought to prefigure the transition toward the active GLIC-pH4 state, suggesting that they might be related to the early events of activation, such as the flipped or primed states. Among the 20 subunit interfaces of these four pentamers, the loop C of the orthosteric site shows a high variability in conformation, from an extended to a contracted conformation, with a 4.3 Å range in the distance from loop B (Arg133-C α) to loop C (Asp 178-C α). Specific interfaces thus appear to have a pre-closed conformation of loop C, a feature proposed through cross-linking experiments to favor primed states and activation (Mukhtasimova et al., 2009).

In parallel, a crystal structure of a GLIC variant carrying a C-terminal poly-histidine tag shows two conformations to co-exist at pH4. In addition to the open form, GLIC adopts a "locally-closed" conformation that is similar to the open form, with a near identical conformation of the ECD, but where the upper part of the M2 α -helix and the M2-M3 loop are in a closed conformation similar to the GLIC-pH7 form (Prevost et al., 2012; Sauguet et al., 2014a). Without the poly-histidine tag, the protein adopts uniquely the open form, but a series of independent mutations altering/disrupting the set of interactions occurring at the ECD/TMD interface promotes multiple locally-closed forms with different local conformations of the M2-M3 loop. These include covalent bridging (M2-M3 loop to loop 2) or point-mutations (Glu19'Pro, Thr25'Ala, and Tyr27'Ala) (Gonzalez-Gutierrez et al., 2013; Prevost et al., 2012). Thus the locally-closed conformation might resemble an intermediate in the activation pathway, whereby the ECD is in the activated form while the TMD is still in the resting form, as inferred from the previously discussed nAChR electrophysiological experiments.

Interestingly, the GLIC(ECD)/ α 1-GlyR(TMD) chimera was also solved in the locally-closed form (Moraga-Cid et al., 2015). In addition, stabilizing this locally-closed conformation for the α 1-GlyR, through disulfide bridging, shows a gain of function phenotype associated with a decrease in the maximal currents, supporting the contribution of this state to the physiological response, possibly as an intermediate during activation and/or desensitization (Prevost et al., 2013b).

Desensitization of pLGICs

A minimum two-state kinetic mechanism for desensitization

In the early 1980s, electrophysiological and stopped-flow experiments on the muscle-type nAChR (from *Rana pipiens* and *Torpedo marmorata* respectively) demonstrated that desensitization is at least biphasic with a 10-100 ms fast-desensitization followed by a 1-60 sec slow-desensitization process (Heidmann and Changeux, 1980; Sakmann et al., 1980). Time-resolved affinity labeling shows that the fast- and slow-desensitized states are structurally distinct (Yamodo et al., 2009)

and electrophysiological recordings suggest that the multi-exponential desensitization processes apply to other pLGICs (Keramidas and Lynch, 2012). Overall, those data were represented by a minimal four-state MWC allosteric model, in which the R and A states isomerize with a fast desensitized "intermediate" I state and a longest-lived desensitized D state (Edelstein et al., 1996; Heidmann and Changeux, 1978; Neubig and Cohen, 2002) (Figure 1B). In addition, single-channel analysis of desensitization suggests a more complex landscape of more than five short-lived and long-lived conformations that could be distinguished by their kinetic properties (Elenes and Auerbach, 2002).

A plausible mechanism for desensitization

Although not gated by GABA, the homomeric $\beta 3$ -GABA_AR structure was crystallized with a bound synthetic agonist, benzamidine (Miller and Aricescu, 2014). The geometry of the M2 α -helices is unlike any other conformation, still generating a funnel-shaped pore, but with a bent curvature in the middle and an anti-clockwise rotation of about 20° of the whole TMD, rotating Leu9' side chains out of the pore leading to a 3 Å increase in its radius in comparison to the open GluCl α (Figure 3). However, the selectivity filter, at the level of Ala-2' forms a narrow hydrophobic constriction of 1.5 Å, thereby preventing ion translocation (Figure 3). This unique conformation was suggested to correspond to a desensitized state, where the activation gate is open but where a putative desensitization-gate would be closed.

Among the protein regions modulating desensitization (reviewed in (Keramidas and Lynch, 2012)), the selectivity filter was shown to be a major locus for mutations altering desensitization in anionic pLGICs. For example, the Pro-2'Thr mutation, that is responsible for hyperekplexia, causes a major acceleration of desensitization of the $\alpha 1$ -GlyR (Saul et al., 1999), and mutations at the bottom of the M2 and M3 α -helices, just behind the selectivity filter, strongly affect desensitization, with minimal effects on activation, in both GlyRs and GABA_ARs (Gielen et al., 2015). In addition, the channel blocker picrotoxin, known to bind between the rings of Thr2' and Pro-2' in the GluCl α (Hibbs and Gouaux, 2011), was shown to inhibit desensitization of anionic pLGICs in the presence of agonist (Gielen et al., 2015), altogether supporting the idea that reorganization of this region is crucial during desensitization. Interestingly, site-directed spin-labeling and electron paramagnetic resonance spectroscopy of GLIC reconstituted in lipidic vesicles suggest that the desensitization-gate is located in the pore under the activation-gate (Velisetty et al., 2012). The occurrence of separate gates for activation and desensitization was previously hypothesized based on kinetic models (Auerbach and Akk, 1998), and revealed based on time-resolved affinity labeling experiments (Yamodo et al., 2009). Interestingly, voltage-clamp fluorometry experiments on the $\alpha 1$ -GlyR point to a major role of the ECD-TMD interface, since desensitization-specific conformational changes are occurring in the vicinity of Ala52 at the tip of loop 2, Gln219 in the pre-M1-region, and Met227 at the top of the M1 α -helix (Wang and Lynch, 2011). In contrast, a majority of positions labeled in the ECD that undergo rearrangements during activation do not appear to move during desensitization, notably residues composing the orthosteric site for glycine (Pless and Lynch, 2009; Wang and Lynch, 2011). Similar observations were made on GABA_ARs showing that the ECD contracts during activation and remains in a similar conformation throughout desensitization (Akk et al., 2010). These observations would support the hypothesis that transitioning from the active-state to the desensitized-state is predominantly achieved by motions in the TMD, reorganizing the ECD-TMD interface and closing the intracellular desensitization-gate.

The functional data on the desensitization-gate show an effect on the slow-desensitizing state (Gielen et al., 2015). It has been suggested that the fast-desensitizing state could arise from an

asymmetric movement of residues on a single subunit that blocks the pore at this level, yielding a closed channel (Yamodo et al., 2009). Therefore the $\beta 3$ -GABA_AR structure could represent the symmetrically more stable slow-desensitized state, whereas the multiple desensitization profiles seen in population measurements could be changes in the population equilibria of asymmetric intermediate desensitized conformations (Prince and Sine, 1999). Further experimentation is needed to elucidate this complexity.

Mechanisms of modulation by allosteric effectors

The pLGIC function is modulated by a variety of natural and synthetic molecules that act at several levels within their structure. Binding sites that are non-overlapping with the orthosteric site are called allosteric according to the IUPAC nomenclature (Christopoulos et al., 2014). Allosteric sites were identified to play a major role in pLGIC regulation by endogenous and exogenous molecules, and the identification of their binding sites started with channel blockers (Giraudat et al., 1986) and modulating ions, such as calcium, which potentiates the $\alpha 7$ -nAChR (Galzi et al., 1996a), or zinc, which inhibits GABA_ARs and potentiates GlyRs (Laube et al., 2000; Wooltorton et al., 1998). Affinity labeling, mutational studies, and X-ray crystallography revealed multiple allosteric binding sites that are scattered throughout the protein, notably at the subunit interface (Hamouda et al., 2013; Sauguet et al., 2014a; Spurny et al., 2015) (Figure 2B).

From the gating reorganizations proposed before, we may now investigate these sites not simply in a pharmacological perspective, but also in view of the mechanisms used to promote activation or desensitization. As previously stated we do not mean to provide a comprehensive picture of all the binding sites that have been recently reviewed, but rather to focus on the particular sites for which conformational changes have been addressed by structural studies.

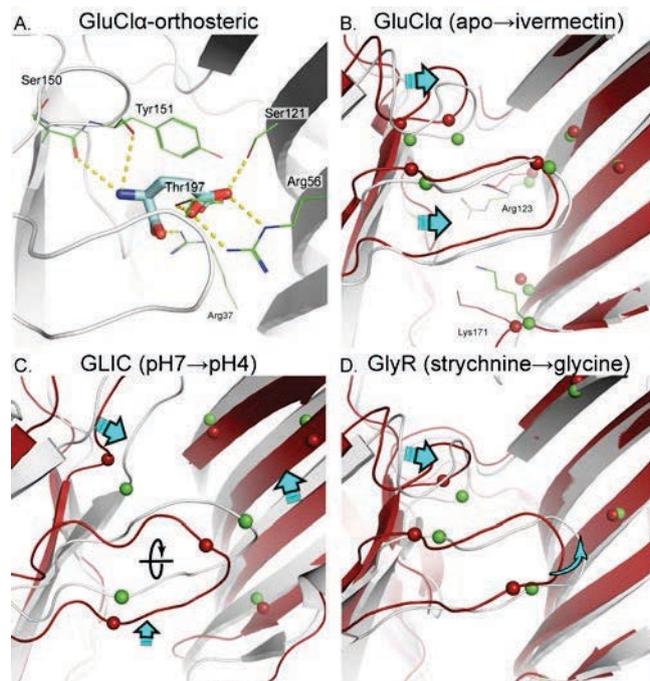


Figure 5: Binding Site Transitions. Side-view rotated 45° on the x-axis of orthosteric pocket. A. GluCl α glutamate-ivermectin (white cartoon, green lines, glutamate in cyan stick representation). Glutamate polar contacts are shown by dashed yellow lines and residues are labeled. B. Overlay of GluCl α -apo (red cartoon and Ca spheres) and -ivermectin bound (white cartoon and green Ca spheres) structures. Residues (Arg123 and Lys171) that switch conformation are shown in line form for both conformations. C. Overlay of GLIC-pH7 (red cartoon and Ca spheres) and -pH4 (white cartoon and green Ca spheres) structures. D. Overlay of GlyR $\alpha 1$ -strychnine (red cartoon and Ca spheres) and -glycine (white cartoon and green Ca spheres) structures. Cyan arrows indicate movement.

Pseudo-orthosteric binding sites

At the ECD, we already described that the contraction of the subunit interface that is concomitant with activation reshapes the orthosteric binding pocket, thereby increasing the affinity for neurotransmitters and agonist. A particular class of positive and negative allosteric modulators (PAMs and NAMs) are known to bind to pseudo-orthosteric sites, which are at the same position of the orthosteric site, but at different subunit interfaces. Benzodiazepines are probably the best described PAMs binding at such sites, and act by increasing the apparent affinity for GABA. They bind to the α/γ interface of GABA_ARs, while GABA binds at the β/α interface (Boileau et al., 1999). These allosteric compounds have been structurally visualized in the orthosteric-like pocket through mutated forms of AChBPs, binding cocaine and other PAMs, as well as benzodiazepine bound to the ELIC structure (Hansen and Taylor, 2007; Spurny et al., 2012). The structure of ELIC in complex with flurazepam shows a binding into such an "inter-subunit" cavity, and it is plausible that their stabilization of a compact interface site contributes to their modulatory action (Spurny et al., 2012).

Allosteric binding sites for general anesthetics and alcohols

As previously mentioned, most pGLICs are modulated, either positively or negatively, by general anesthetics. Structural and functional studies have shown that general anesthetics, which are small amphipatic compounds, bind at multiple locations on pGLICs including: the ECD (Spurny et al., 2013), the ECD/TMD interface (Yip et al., 2013), and in the central channel (Fourati et al., 2015; Spurny et al., 2013). It is believed that their predominant mode of action resides in the upper part of the TMD within the intra-subunit bundle of α -helices (Nury et al., 2011).

GLIC, which is inhibited by general anesthetics at clinical concentrations (Weng et al., 2009), has been used as a model to investigate their mechanism of action. Co-crystallization of GLIC in the active-state, at pH4, with desflurane and propofol showed that they bind to a common "intrasubunit" cavity in the upper part of the TMD, lined by residues from the M1, M2, and M3 α -helices (Nury et al., 2011). Affinity labeling experiments show that a photo-activatable propofol derivative binds similarly to the muscle nAChR, and pharmacological assays suggest it labels a desensitized conformation (Chiara et al., 2013; Jayakar et al., 2013).

Subsequently, mutational screening identified a GLIC single mutant, Phe14'Ala, that is potentiated by general anesthetics and ethanol (Howard et al., 2011). The GLIC-Phe14'Ala mutant exhibits the same active-state crystal conformation as wild-type GLIC (Sauguet et al., 2013a) but removal of the phenyl-moiety creates a new cavity at the subunit interface (Figure 6C). Structural inspection of the resting-state of GLIC shows that the cavity is profoundly reorganized as the consequence of the tilt of the upper part of the M2 α -helix. A cavity, accessible from the vestibule in the resting conformation, is reduced in size upon activation with the overall TMD motions bringing Glu19' and Asn15' into proximity with ethanol enabling hydrogen bonding interactions (Figure 6C). Ethanol and bromoform, which both potentiate the receptor, bind in this cavity and stabilize the open-conformation, as indicated by an important decrease in crystal structure B-factors. Mutations of Ile16'Phe and Asn15'Ala with Phe14'Ala show an impaired potentiation, and are consistent with a scheme where ethanol and other general anesthetics bind to a preformed cavity in the upper hydrophobic compartment of the TMD, providing energetic stabilization of the active-state (Sauguet et al., 2013a).

Allosteric binding sites for other modulators and lipids

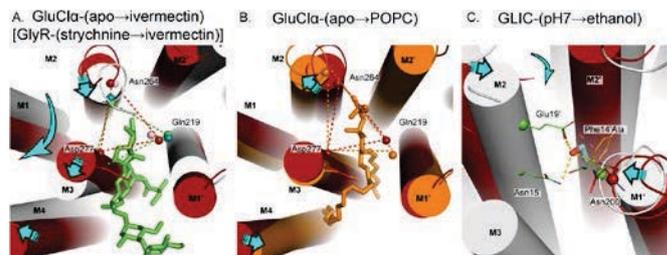


Figure 6: Allosteric Site Transitions. A. Top down view of TMD overlay of GluCl α -apo (red cartoon/cylinders and Ca atom spheres) with -ivermectin bound (white cartoon/cylinders and green Ca atom spheres), and GlyR α 1-strychnine (pink Ca atom spheres) and GlyR α 1-strychnine (teal Ca atom spheres) structures. Cylinders of GlyR structures are not shown as they are synonymous with GluCl α . Ivermectin from GluCl α is shown in green stick representation. B. Top down view of TMD overlay of GluCl α -apo (red cartoon/cylinders and Ca atom spheres) with -POPC bound (orange cartoon/cylinders and Ca atom spheres) structures. POPC is shown in orange stick representation. A. and B. Principal and complementary (with primes) subunit helices are labeled. Cyan arrows indicate movement from resting to active or resting to POPC. Residues of Ca spheres are labeled for GluCl α , and respectively colored dashed-lines are shown to emphasize change in cavity space. C. Top down view, rotated 45° on the x axis, of an overlay of the TMD of GLIC-pH7 (red cartoon/cylinders, Ca spheres, and lines) with -pH4 ethanol-bound Phe14'Ala mutant (white cartoon/cylinders, green Ca spheres and lines). Ethanol is shown as cyan stick representation. Phe14' of the open GLIC structure is shown in orange line representation. Residues (Asn15', Glu19' and Asn200) with polar interaction (shown as yellow dashed lines) to ethanol are labeled and shown as lines with Ca spheres.

The GluCl α -ivermectin and α 1-GlyR-ivermectin structures provide unique information about the underlying molecular mechanisms of PAMs and allosteric agonists acting at the TMD inter-subunit interface. Ivermectin is an allosteric agonist of GluCl α , and a quasi-irreversible potentiator of the α 1-GlyR, also acting at its TMD (Duret et al., 2011; Hibbs and Gouaux, 2011). Ivermectin contacts the M2 and M3 α -helices from the "principal" subunit, and the M1 α -helix from the "complementary" subunit (Figure 6A). This cavity is accessible from the extra-vestibular lipid environment, whereas the previously described general anesthetic site is accessible from the channel (Figure 6). An analysis between the resting-apo and ivermectin-bound open forms of GluCl α , as well as the strychnine-closed and ivermectin-bound open forms of α 1-GlyR shows that ivermectin is situated between an expansion of the M1 and M3 α -helices in the inter-subunit cavity (Figure 6A). The cavity created by ivermectin is not seen with comparisons to other structures, such as those of GLIC, 5-HT $_3$ AR, or β 3-GABA $_A$ R.

Interestingly, GluCl α -apo crystals, grown in the presence of 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC), were found, after a month long incubation at 4°C, to yield a new conformation of GluCl α with a POPC molecule bound at the level of the ivermectin-binding site. The choline moiety of POPC blocks the M2 α -helix from tilting towards the M1 α -helix; whereby the open-pore conformation with ivermectin is not seen and the M3/M4 α -helices resemble that of the apo structure, yet the constriction of the pore in the apo structure is also not present (Figure 3, Figure 6B). Although POPC blocks the M2 α -helix from tilting away into the open conformation, the push into the vestibule actually produces a more open rotation than that of the apo structure. Surprisingly the selectivity filter at -2' is reorganized to a rather exacerbated, open conformation, a phenomenon that is also seen in the α 1-GlyR-glycine bound structure. This suggests that POPC may trap a conformation resulting from thermal fluctuation and causes a local distortion of the protein structure (Koshland, 1959). Arg123 of the orthosteric pocket maintains the open form rotamer, while Lys171 maintains the apo form, adding to the uniqueness of the POPC structure (Figure 5B).

Altogether, these data suggest that the TMD displays an overall higher degree of tertiary structural flexibility as compared to the β -sandwich core of the ECD. This distinctive feature may be important in mediating the action of lipids and cholesterol (daCosta et al., 2013), as well as PAMs and NAMs, notably those developed

on the $\alpha 7$ -nAChRs, which are thought to bind at an intra-subunit cavity (Gill-Thind et al., 2014).

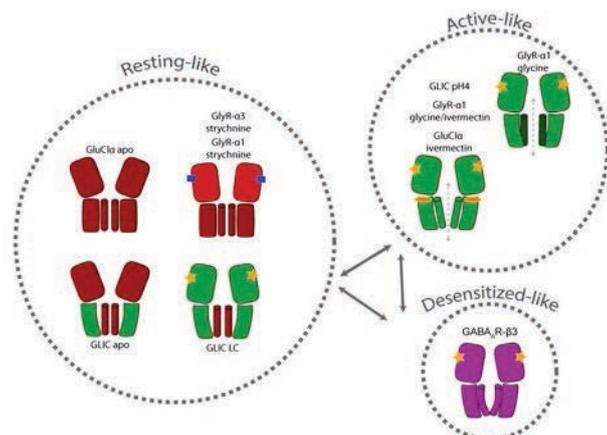


Figure 7: Hypothetical classification of known structures into the physiological three state (Resting, Active, and Desensitized) model. Highly simplified structures are represented as two subunit compositions with the ECD as a large rectangle and the TMD as a small rectangle and a cylinder for M2, with color coding representing similar conformations. Resting-like apo conformations show two distinct forms (GluCl α -apo and GLIC-pH7); meanwhile antagonist-bound conformations and the locally-closed conformation of GLIC would also be considered resting-states. The active-like conformations of GLIC-pH4, as well as ivermectin-bound GluCl α and $\alpha 1$ -GlyR could be grouped into one synonymous active-state, whereas the expanded glycine-bound $\alpha 1$ -GlyR conformation would define another. Finally only one structure has been unequivocally deemed to be in a desensitized-like conformation, which is that of the $\beta 3$ -GABA $_A$ R. Assignment of the ELIC, 5-HT $_2A$, and POPC-bound GluCl α structures remains elusive and therefore these are not represented.

Conclusion

50 years after the publication of the MWC theory, the molecular mechanism of signal transduction of pLGICs is emerging thanks to the comparison of X-ray structures in different conformations (Figure 7). The ECD of homopentameric pLGICs undergo quaternary motions that greatly alter the regulatory orthosteric binding-site, located at the subunit interface (Figure 4, Figure 5). Although functionally unique between subfamilies, the motions in the ECD seem highly conserved, whereas the TMD seems more flexible and/or variable in conformational changes among species. In the near future, it is likely that new structures will be released, providing an assessment of the pertinence and accuracy of gating models developed for mammalian pLGICs from lower organism pLGICs.

A central hypothesis of the MWC theory is that ligands stabilize the state for which they display the highest affinity. The activation model summarized here suggests how neurotransmitters might stabilize receptor activation at the synapse and allow speculation about the structural basis for such affinity differences at the orthosteric site, and some key allosteric sites. The data reviewed could provide the basis for the design of molecules targeting specific sites involved in pLGIC modulation. To optimize ligand affinity, previous *in silico* models have relied mainly on fixed conformations of pLGICs in order to investigate the ligand-receptor interaction. The gating models presented here should stimulate investigation of the relative affinity between states that govern ligand efficacy, paving the way for the rational design of positive or negative allosteric modulators as well as orthosteric agonists and competitive antagonists.

Acknowledgements:

The authors would like to thank Marc Gielen for insightful discussions; Jean-Pierre Changeux, Marc Delarue, Stuart Edelstein, and Marc Gielen for critical reading of the manuscript; and acknowledge financial support by the Agence Nationale de la Recherche "ANR pentagate" (A.N.) and the Fondation de la Recherche Médicale "Equipe FRM DEQ20140329497".

References:

- Adams, D.J., Dwyer, T.M., and Hille, B. (1980). The permeability of endplate channels to monovalent and divalent metal cations. *The Journal of General Physiology* 75, 493–510.
- Akk, G., Li, P., Bracamontes, J., Wang, M., and Steinbach, J.H. (2010). Pharmacology of structural changes at the GABA(A) receptor transmitter binding site. *British Journal of Pharmacology* 162, 840–850.
- Albuquerque, E.X., Pereira, E.F.R., Alkondon, M., and Rogers, S.W. (2009). Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 89, 73–120.
- Althoff, T., Hibbs, R.E., Banerjee, S., and Gouaux, E. (2014). X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature* 512, 333–337.
- Arroyo, S., Bennett, C., and Hestrin, S. (2014). Nicotinic modulation of cortical circuits. *Frontiers in Neural Circuits* 8, 30.
- Aryal, P., Sansom, M.S.P., and Tucker, S.J. (2014). Hydrophobic gating in ion channels. *J Mol Biol* 427, 121–130.
- Auerbach, A., and Akk, G. (1998). Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *The Journal of General Physiology* 112, 181–197.
- Auerbach, A. (2012). Thinking in cycles: MWC is a good model for acetylcholine receptor-channels. *The Journal of Physiology* 590, 93–98.
- Baer, K., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., and Rees, M.I. (2009). Localization of glycine receptors in the human forebrain, brainstem, and cervical spinal cord: an immunohistochemical review. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2, 25.
- Barrantes, F.J. (2014). Cell-surface translational dynamics of nicotinic acetylcholine receptors. *Frontiers in Synaptic Neuroscience* 6, 25.
- Beeson, D., Morris, A., Vincent, A., and Newsom-Davis, J. (1990). The human muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit exist as two isoforms: a novel exon. *EMBO J* 9, 2101–2106.
- Berka, K., Hanák, O., Sehnal, D., Banás, P., Navrátilová, V., Jaiswal, D., Ionescu, C.-M., Váreková, R.S., Koca, J., and Otyepka, M. (2012). MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids Res* 40, W222–7.
- Bertaccini, E.J., Lindahl, E., Sixma, T., and Trudell, J.R. (2008). Effect of cobratoxin binding on the normal mode vibration within acetylcholine binding protein. *Journal of Chemical Information and Modeling* 48, 855–860.
- Bertrand, D., and Gopalakrishnan, M. (2007). Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74, 1155–1163.
- Betz, H., and Laube, B. (2006). Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry* 97, 1600–1610.
- Billen, B., Spurny, R., Brams, M., van Elk, R., Valera-Kummer, S., Yakel, J.L., Voets, T., Bertrand, D., Smit, A.B., and Ulens, C. (2012). Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 9173–9178.
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2008). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457, 111–114.
- Bocquet, N., de Carvalho, L.P., Cartaud, J., Neyton, J., Le Poupon, C., Taly, A., Grutter, T., Changeux, J.-P., and Corringer, P.-J. (2006). A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445, 116–119.
- Bode, A., and Lynch, J.W. (2014). The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Mol Brain* 7, 2.
- Boileau, A.J., Evers, A.R., Davis, A.F., and Czajkowski, C. (1999). Mapping the agonist binding site of the GABA $_A$ receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci* 19, 4847–4854.
- Bormann, J., Rundström, N., Betz, H., and Langosch, D. (1994). Residues within transmembrane segment M2 determine chloride conductance of glycine receptor homo- and hetero-oligomers. *EMBO J* 13, 1493.
- Bourne, Y., Radić, Z., Aráoz, R., Talley, T.T., Benoit, E., Servent, D., Taylor, P., Molgó, J., and Marchot, P. (2010). Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 6076–6081.
- Bouzat, C. (2011). New insights into the structural bases of activation of Cys-loop receptors. *J Physiol Paris* 106, 23–33.
- Braat, S., and Kooy, R.F. (2015). The GABA $_A$ Receptor as a Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders. *Neuron* 86, 1119–1130.
- Brejč, K., van Dijk, W.J., Klaassen, R.V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A.B., and Sixma, T.K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269–276.
- Brickley, S.G., and Mody, I. (2012). Extrasynaptic GABA(A) receptors: their function in the CNS and implications for disease. *Neuron* 73, 23–34.

- Brüss, M., Göthert, M., Hayer, M., and Bönisch, H. (1999). Molecular cloning of alternatively spliced human 5-HT₃ receptor cDNAs. *Annals of the New York Academy of Sciences* 861, 234–235.
- Calimet, N., Simoes, M., Changeux, J.-P., Karplus, M., Taly, A., and Cecchini, M. (2013). A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, E3987–96.
- Campling, B.G., Kuryatov, A., and Lindstrom, J. (2013). Acute activation, desensitization and smoldering activation of human acetylcholine receptors. *PLoS ONE* 8, e79653.
- Carland, J.E., Cooper, M.A., Livesey, M.R., Hales, T.G., Peters, J.A., and Lambert, J.J. (2013). Mutagenic analysis of the intracellular portals of the human 5-HT_{3A} receptor. *J Biol Chem* 288, 31592–31601.
- Cartaud, J., Benedetti, E.L., Cohen, J.B., Meunier, J.C., and Changeux, J.-P. (1973). Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Lett* 33, 109–113.
- Cecchini, M., and Changeux, J.-P. (2014). The nicotinic acetylcholine receptor and its prokaryotic homologues: Structure, conformational transitions & allosteric modulation. *Neuropharmacology* 96, 137–149.
- Chakrapani, S., and Auerbach, A. (2004). A speed limit for conformational change of an allosteric membrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 87–92.
- Chang, Y., and Weiss, D.S. (1999). Allosteric activation mechanism of the alpha 1 beta 2 gamma 2 gamma aminobutyric acid type A receptor revealed by mutation of the conserved M2 leucine. *Biophysical Journal* 77, 2542–2551.
- Changeux, J.-P., Kasai, M., Huchet, M., and Meunier, J.C. (1970). [Extraction from electric tissue of gymnotus of a protein presenting several typical properties characteristic of the physiological receptor of acetylcholine]. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances De l'Académie Des Sciences Série D: Sciences Naturelles* 270, 2864–2867.
- Cheng, X., and Sine, S.M. (2011). Intramembrane proton binding site linked to activation of bacterial pentameric ion channel. *J Biol Chem* 287, 6482–6489.
- Cheng, X., Taylor, P., McCammon, J.A., and Sine, S.M. (2008). Control of cation permeation through the nicotinic receptor channel. *PLoS Comput Biol* 4, e41.
- Chiara, D.C., Gill, J.F., Chen, Q., Tillman, T., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., Xu, Y., Tang, P., and Cohen, J.B. (2013). Photoaffinity labeling the propofol binding site in GLIC. *Biochemistry* 53, 135–142.
- Christian, C.A., Herbert, A.G., Holt, R.L., Peng, K., Sherwood, K.D., Pangratz-Fuehrer, S., Rudolph, U., and Huguenard, J.R. (2013). Endogenous positive allosteric modulation of GABA(A) receptors by diazepam binding inhibitor. *Neuron* 78, 1063–1074.
- Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W.A., Fabbro, D., Burris, T.P., Cidowski, J.A., Olsen, R.W., Peters, J.A., Neubig, R.R., Pin, J.-P., et al. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. multisite pharmacology: recommendations for the nomenclature of receptor allostery and allosteric ligands. *Pharmacological Reviews* 66, 918–947.
- Colquhoun, D., and Sakmann, B. (1998). From muscle endplate to brain synapses: a short history of synapses and agonist-activated ion channels. *Neuron* 20, 381–387.
- Corringer, P.-J., Bertrand, S., Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J.-P., and Bertrand, D. (1999). Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 22, 831–843.
- Corringer, P.-J., Poitevin, F., Prevost, M.S., Sauguet, L., Delarue, M., and Changeux, J.-P. (2012). Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. *Structure (London, England : 1993)* 20, 941–56.
- Couturier, S., Bertrand, D., Matter, J.M., Hernandez, M.C., Bertrand, S., Millar, N., Valera, S., Barkas, T., and Ballivet, M. (1990). A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5, 847–856.
- Cutting, G.R., Lu, L., O'Hara, B.F., Kasch, L.M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D.M., Shimada, S., Antonarakis, S.E., Guggino, W.B., and Uhl, G.R. (1991). Cloning of the gamma-aminobutyric acid (GABA) rho 1 cDNA: a GABA receptor subunit highly expressed in the retina. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 2673–2677.
- Cymes, G.D., and Grosman, C. (2012). The unanticipated complexity of the selectivity-filter glutamates of nicotinic receptors. *Nature Chemical Biology* 8, 975–981.
- Cymes, G.D., Ni, Y., and Grosman, C. (2005). Probing ion-channel pores one proton at a time. *Nature* 438, 975–980.
- Davies, P.A., Pistis, M., Hanna, M.C., Peters, J.A., Lambert, J.J., Hales, T.G., and Kirkness, E.F. (1999). The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397, 359–363.
- De Biasi, M., and Dani, J.A. (2011). Reward, addiction, withdrawal to nicotine. *Annual Review of Neuroscience* 34, 105–130.
- Dellisanti, C.D., Yao, Y., Stroud, J.C., Wang, Z.-Z., and Chen, L. (2007). Crystal structure of the extracellular domain of nAChR alpha1 bound to alpha-bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nature Neuroscience* 10, 953–62.
- Dent, J.A. (2010). The evolution of pentameric ligand-gated ion channels. *Adv Exp Med Biol* 683, 11–23.
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.-F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot, M., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36, W465–9.
- Di Maio, D., Chandramouli, B., and Brancato, G. (2015). Pathways and Barriers for Ion Translocation through the 5-HT_{3A} Receptor Channel. *PLoS ONE* 10, e0140258.
- Dineley, K.T., Pandya, A.A., and Yakel, J.L. (2015). Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends Pharmacol Sci* 36, 96–108.
- Du, J., Lü, W., Wu, S., Cheng, Y., and Gouaux, E. (2015). Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. *Nature* 526, 224–229.
- Duret, G., Van Renterghem, C., Weng, Y., Prevost, M., Moraga-Cid, G., Huon, C., Sonner, J.M., and Corringer, P.-J. (2011). Functional prokaryotic-eukaryotic chimera from the pentameric ligand-gated ion channel family. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 12143–12148.
- Edelstein, S.J., Schaad, O., Henry, E., Bertrand, D., and Changeux, J.-P. (1996). A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. *Biol Cybern* 75, 361–379.
- Edelstein, S.J., and Changeux, J.-P. (2010). Relationships between structural dynamics and functional kinetics in oligomeric membrane receptors. *Biophysical Journal* 98, 2045–2052.
- Eiselé, J.L., Bertrand, S., Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J.-P., and Bertrand, D. (1993). Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366, 479–483.
- Elenes, S., and Auerbach, A. (2002). Desensitization of diliganded mouse muscle nicotinic acetylcholine receptor channels. *The Journal of Physiology* 541, 367–383.
- Elgoyhen, A.B., Johnson, D.S., Boulter, J., Vetter, D.E., and Heinemann, S. (1994). Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79, 705–715.
- Elgoyhen, A.B., Vetter, D.E., Katz, E., Rothlin, C.V., Heinemann, S.F., and Boulter, J. (2001). alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 3501–3506.
- Forman, S.A., Chiara, D.C., and Miller, K.W. (2014). Anesthetics target interfacial transmembrane sites in nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 96, 169–177.
- Fourati, Z., Sauguet, L., and Delarue, M. (2015). Genuine open form of the pentameric ligand-gated ion channel GLIC. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 71, 454–460.
- Franks, N.P. (2008). General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nature Reviews Neuroscience* 9, 370–386.
- Fritschy, J.-M., and Panzanelli, P. (2014). GABAA receptors and plasticity of inhibitory neurotransmission in the central nervous system. *Eur J Neurosci* 39, 1845–1865.
- Fritschy, J.-M., Harvey, R.J., and Schwarz, G. (2008). Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends Neurosci* 31, 257–264.
- Galzi, J.L., Bertrand, S., Corringer, P.J., Changeux, J.-P., and Bertrand, D. (1996a). Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* 15, 5824–5832.
- Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Hussy, N., Bertrand, S., Changeux, J.-P., and Bertrand, D. (1992). Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359, 500–505.
- Galzi, J.L., Edelstein, S.J., and Changeux, J.-P. (1996b). The multiple phenotypes of allosteric receptor mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1853–1858.
- Gielen, M., Thomas, P., and Smart, T.G. (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nature Communications* 6, 6829.
- Gill-Thing, J.K., Dhankher, P., D'Oyley, J.M., Sheppard, T.D., and Millar, N.S. (2014). Structurally similar allosteric modulators of alpha7 nicotinic acetylcholine receptors exhibit five distinct pharmacological effects. *J Biol Chem* 290, 3552–3562.
- Giraudat, J., Dennis, M., Heidmann, T., Chang, J.Y., and Changeux, J.-P. (1986). Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine-262 of the delta subunit is labeled by [3H]chlorpromazine. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2719–2723.
- Gonzalez-Gutierrez, G., Cuello, L.G., Nair, S.K., and Grosman, C. (2013). Gating of the proton-gated ion channel from *Gloeobacter violaceus* at pH 4 as revealed by X-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 18716–18721.
- Goyal, R., Salahudeen, A.A., and Jansen, M. (2011). Engineering a prokaryotic Cys-loop receptor with a third functional domain. *J Biol Chem* 286, 34635–34642.
- Grenningloh, G., Schmieden, V., Schofield, P.R., Seeburg, P.H., Siddique, T., Mohandas, T.K., Becker, C.M., and Betz, H. (1990). Alpha subunit variants of the human glycine receptor: primary structures, functional expression and chromosomal localization of the corresponding genes. *EMBO J* 9, 771–776.

- Grutter, T., de Carvalho, L.P., Virginie, D., Taly, A., Fischer, M., and Changeux, J.-P. (2005). A chimera encoding the fusion of an acetylcholine-binding protein to an ion channel is stabilized in a state close to the desensitized form of ligand-gated ion channels. *C R Biol* 328, 223–34.
- Hamouda, A.K., Jayakar, S.S., Chiara, D.C., and Cohen, J.B. (2013). Photoaffinity labeling of nicotinic receptors: diversity of drug binding sites! *J Mol Neurosci* 53, 480–486.
- Han, L., Talwar, S., Wang, Q., Shan, Q., and Lynch, J.W. (2013). Phosphorylation of $\alpha 3$ glycine receptors induces a conformational change in the glycine-binding site. *ACS Chemical Neuroscience* 4, 1361–1370.
- Hansen, S.B., and Taylor, P. (2007). Galanthamine and non-competitive inhibitor binding to ACh-binding protein: evidence for a binding site on non- α -subunit interfaces of heteromeric neuronal nicotinic receptors. *J Mol Biol* 369, 895–901.
- Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., and Bourne, Y. (2005). Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* 24, 3635–3646.
- Hansen, S.B., Taylor, P., and Sine, S.M. (2008). An ion selectivity filter in the extracellular domain of Cys-loop receptors reveals determinants for ion conductance. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 36066–70.
- Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Tol, M.B., Hovius, R., Graff, A., Stahlberg, H., Tomizaki, T., Desmyter, A., et al. (2014). X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* 512, 276–281.
- Heidmann, T., and Changeux, J.P. (1978). Structural and functional properties of the acetylcholine receptor protein in its purified and membrane-bound states. *Annual Review of Biochemistry* 47, 317–357.
- Heidmann, T., and Changeux, J.-P. (1980). Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in the millisecond time range: resolution of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects. *Biochem Biophys Res Commun* 97, 889–96.
- Heidmann, T., and Changeux, J.-P. (1982). [Molecular model of the regulation of chemical synapse efficiency at the postsynaptic level]. *C R Seances Acad Sci III* 295, 665–670.
- Hibbs, R.E., and Gouaux, E. (2011). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474, 54–60.
- Hilf, R.J.C., and Dutzler, R. (2008a). X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452, 375–379.
- Hilf, R.J.C., and Dutzler, R. (2008b). Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457, 115–118.
- Hosie, A.M., Wilkins, M.E., da Silva, H.M.A., and Smart, T.G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABA_A receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* 444, 486–489.
- Howard, R.J., Slesinger, P.A., Davies, D.L., Das, J., Trudell, J.R., and Harris, R.A. (2011). Alcohol-binding sites in distinct brain proteins: the quest for atomic level resolution. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 35, 1561–1573.
- Huang, J., Wang, H., Cui, Y., Zhang, G., Zheng, G., Liu, S., Xie, L., and Zhang, R. (2009). Identification and comparison of amorphous calcium carbonate-binding protein and acetylcholine-binding protein in the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Mar Biotechnol* 11, 596–607.
- Huang, S., Li, S.-X., Bren, N., Cheng, K., Gomoto, R., Chen, L., and Sine, S.M. (2013). Complex between α -bungarotoxin and an $\alpha 7$ nicotinic receptor ligand-binding domain chimera. *Biochem J* 454, 303–310.
- Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., and Shaffer, P.L. (2015). Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature* 526, 277–280.
- James, J.R., and Nordberg, A. (1995). Genetic and environmental aspects of the role of nicotinic receptors in neurodegenerative disorders: emphasis on Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Behav Genet* 25, 149–159.
- Jayakar, S.S., Dailey, W.P., Eckenhoff, R.G., and Cohen, J.B. (2013). Identification of propofol binding sites in a nicotinic acetylcholine receptor with a photoreactive propofol analog. *J Biol Chem* 288, 6178–6189.
- Jones, M.V., and Westbrook, G.L. (1996). The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19, 96–101.
- Katz, B., and Miledi, R. (1965). The Measurement of Synaptic Delay, and the Time Course of Acetylcholine Release at the Neuromuscular Junction. *Proc R Soc Lond, B, Biol Sci* 161, 483–495.
- Katz, B., and Miledi, R. (1973). The binding of acetylcholine to receptors and its removal from the synaptic cleft. *The Journal of Physiology* 231, 549–574.
- Katz, B., and Thesleff, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of Physiology* 138, 63–80.
- Kelley, S.P., Dunlop, J.I., Kirkness, E.F., Lambert, J.J., and Peters, J.A. (2003). A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424, 321–4.
- Keramidas, A., and Lynch, J.W. (2012). An outline of desensitization in pentameric ligand-gated ion channel receptors. *Cell Mol Life Sci* 70, 1241–1253.
- Keramidas, A., Moorhouse, A.J., Schofield, P.R., and Barry, P.H. (2004). Ligand-gated ion channels: mechanisms underlying ion selectivity. *Prog Biophys Mol Biol* 86, 161–204.
- Kesters, D., Thompson, A.J., Brams, M., van Elk, R., Spurny, R., Geitmann, M., Villalgorido, J.M., Guskov, A., Danielson, U.H., Lummis, S.C.R., et al. (2012). Structural basis of ligand recognition in 5-HT₃ receptors. *EMBO Rep* 14, 49–56.
- Koshland, D.E. (1959). Enzyme flexibility and enzyme action. *J Cell Comp Physiol* 54, 245–258.
- Kracun, S., Harkness, P.C., Gibb, A.J., and Millar, N.S. (2008). Influence of the M3-M4 intracellular domain upon nicotinic acetylcholine receptor assembly, targeting and function. *British Journal of Pharmacology* 153, 1474–1484.
- Krashia, P., Lape, R., Lodesani, F., Colquhoun, D., and Sivilotti, L.G. (2011). The long activations of $\alpha 2$ glycine channels can be described by a mechanism with reaction intermediates ("flip"). *The Journal of General Physiology* 137, 197–216.
- Kuhse, J., Schmieden, V., and Betz, H. (1990). Identification and functional expression of a novel ligand binding subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 265, 22317–22320.
- Kusama, T., Wang, T.L., Guggino, W.B., Cutting, G.R., and Uhl, G.R. (1993). GABA ρ 2 receptor pharmacological profile: GABA recognition site similarities to ρ 1. *Eur J Pharmacol* 245, 83–84.
- Labarca, C., Nowak, M.W., Zhang, H., Tang, L., Deshpande, P., and Lester, H.A. (1995). Channel gating governed symmetrically by conserved leucine residues in the M2 domain of nicotinic receptors. *Nature* 376, 514–516.
- Langley, J.N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. *The Journal of Physiology* 33, 374–413.
- Langosch, D., Thomas, L., and Betz, H. (1988). Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7394–7398.
- Lape, R., Colquhoun, D., and Sivilotti, L.G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature* 454, 722–727.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., et al. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Laube, B., Kuhse, J., and Betz, H. (2000). Kinetic and mutational analysis of Zn²⁺ modulation of recombinant human inhibitory glycine receptors. *The Journal of Physiology* 522 Pt 2, 215–230.
- Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (2000). Channelopathies.
- Leonard, S., Gault, J., Hopkins, J., Logel, J., Vianzon, R., Short, M., Drebing, C., Berger, R., Venn, D., Sirota, P., et al. (2002). Association of promoter variants in the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor subunit gene with an inhibitory deficit found in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 59, 1085–1096.
- Lobo, I.A., and Harris, R.A. (2005). Sites of alcohol and volatile anesthetic action on glycine receptors. *Int Rev Neurobiol* 65, 53–87.
- Lummis, S.C.R. (2012). 5-HT(3) receptors. *J Biol Chem* 287, 40239–40245.
- Macdonald, R.L., Kang, J.-Q., and Gallagher, M.J. (2010). Mutations in GABA_A receptor subunits associated with genetic epilepsies. *The Journal of Physiology* 588, 1861–1869.
- Marabelli, A., Lape, R., and Sivilotti, L. (2014). Mechanism of activation of the prokaryotic channel ELIC by propylamine: a single-channel study. *The Journal of General Physiology* 145, 23–45.
- Maricq, A.V., Peterson, A.S., Brake, A.J., Myers, R.M., and Julius, D. (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254, 432–437.
- McKinley, D.D., Lennon, D.J., and Carter, D.B. (1995). Cloning, sequence analysis and expression of two forms of mRNA coding for the human β 2 subunit of the GABA_A receptor. *Brain Res Mol Brain Res* 28, 175–179.
- Miller, P.S., and Aricescu, A.R. (2014). Crystal structure of a human GABA_A receptor. *Nature* 512, 270–275.
- Miquel, M.C., Emerit, M.B., Nosjean, A., Simon, A., Rumajogee, P., Brisorgueil, M.J., Doucet, E., Hamon, M., and Vergé, D. (2002). Differential subcellular localization of the 5-HT₃-As receptor subunit in the rat central nervous system. *Eur J Neurosci* 15, 449–457.
- Mishina, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S., Methfessel, C., and Sakmann, B. (1986). Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321, 406–411.
- Miwa, J.M., Freedman, R., and Lester, H.A. (2011). Neural systems governed by nicotinic acetylcholine receptors: emerging hypotheses. *Neuron* 70, 20–33.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y., Stowell, M., and Unwin, N. (1999). Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288, 765–786.
- Mnatsakanyan, N., Nishtala, S.N., Pandhare, A., Fiori, M.C., Goyal, R., Pauwels, J.E., Navetta, A.F., Ahrorov, A., and Jansen, M. (2015). Functional

- Chimeras of GLIC Obtained by Adding the Intracellular Domain of Anion- and Cation-Conducting Cys-Loop Receptors. *Biochemistry* 54, 2670–2682.
- Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.-P. (1965). On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12, 88–118.
- Moraga-Cid, G., Sauguet, L., Huon, C., Malherbe, L., Girard-Blanc, C., Petres, S., Murail, S., Taly, A., Baaden, M., Delarue, M., et al. (2015). Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on an $\alpha 1$ glycine receptor transmembrane structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, 2865–2870.
- Mowrey, D.D., Kinde, M.N., Xu, Y., and Tang, P. (2014). Atomistic insights into human Cys-loop receptors by solution NMR. *Biochim Biophys Acta* 1848, 307–314.
- Mukhtasimova, N., Lee, W.Y., and Sine, S.M. (2009). Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature* 459, 451–454.
- Nemecz, Á., and Taylor, P. (2011). Creating an $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine recognition domain from the acetylcholine-binding protein: crystallographic and ligand selectivity analyses. *J Biol Chem* 286, 42555–42565.
- Neubig, R.R., and Cohen, J.B. (2002). Permeability control by cholinergic receptors in Torpedo postsynaptic membranes: agonist dose-response relations measured at second and millisecond times. *Biochemistry*.
- Nury, H., Bocquet, N., Le Poupon, C., Raynal, B., Haouz, A., Corringer, P.-J., and Delarue, M. (2009). Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel. *J Mol Biol* 395, 1114–1127.
- Nury, H., Poitevin, F., Van Renterghem, C., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010). One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 6275–6280.
- Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J.-P., Sonner, J.M., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2011). X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469, 428–431.
- Nys, M., Kesters, D., and Ulens, C. (2013). Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol* 86, 1042–1053.
- Pan, J., Chen, Q., Willenbring, D., Yoshida, K., Tillman, T., Kashlan, O.B., Cohen, A., Kong, X.-P., Xu, Y., and Tang, P. (2012). Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine. *Nature Communications* 3, 714.
- Papke, D., Gonzalez-Gutierrez, G., and Grosman, C. (2011). Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: a comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors. *The Journal of Physiology* 589, 1571–1585.
- Pilorge, M., Fassier, C., Le Corronc, H., Potey, A., Bai, J., De Gois, S., Delaby, E., Assouline, B., Guinchat, V., Devillard, F., et al. (2015). Genetic and functional analyses demonstrate a role for abnormal glycinergic signaling in autism. *Mol Psychiatry*.
- Pless, S.A., and Lynch, J.W. (2009). Ligand-specific conformational changes in the $\alpha 1$ glycine receptor ligand-binding domain. *J Biol Chem* 284, 15847–15856.
- Prevost, M.S., Delarue-Cochin, S., Marteaux, J., Colas, C., Van Renterghem, C., Blondel, A., Malliavin, T., Corringer, P.-J., and Joseph, D. (2013a). Identification of cinnamic acid derivatives as novel antagonists of the prokaryotic proton-gated ion channel GLIC. *Journal of Medicinal Chemistry* 56, 4619–4630.
- Prevost, M.S., Moraga-Cid, G., Van Renterghem, C., Edelstein, S.J., Changeux, J.-P., and Corringer, P.-J. (2013b). Intermediate closed state for glycine receptor function revealed by cysteine cross-linking. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 17113–17118.
- Prevost, M.S., Sauguet, L., Nury, H., Van Renterghem, C., Huon, C., Poitevin, F., Baaden, M., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2012). A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 19, 642–649.
- Prince, R.J., and Sine, S.M. (1999). Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J Biol Chem* 274, 19623–19629.
- Purohit, P., and Auerbach, A. (2008). Unliganded gating of acetylcholine receptor channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 115–120.
- Purohit, P., Gupta, S., Jaday, S., and Auerbach, A. (2013). Functional anatomy of an allosteric protein. *Nature Communications* 4, 2984.
- Qian, H., and Dowling, J.E. (1993). Novel GABA responses from rod-driven retinal horizontal cells. *Nature* 361, 162–164.
- Revah, F., Bertrand, D., Galzi, J.L., Devillers-Thiéry, A., Mulle, C., Hussy, N., Bertrand, S., Ballivet, M., and Changeux, J.P. (1991). Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353, 846–849.
- Rienzo, M., Lummis, S.C.R., and Dougherty, D.A. (2014). Structural requirements in the transmembrane domain of GLIC revealed by incorporation of noncanonical histidine analogs. *Chem Biol* 21, 1700–1706.
- Rucktooa, P., Smit, A.B., and Sixma, T.K. (2009). Insight in nAChR subtype selectivity from AChBP crystal structures. *Biochem Pharmacol* 78, 777–787.
- Rundström, N., Schmieden, V., Betz, H., Bormann, J., and Langosch, D. (1994). Cyanotriphenylborate: subtype-specific blocker of glycine receptor chloride channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 8950–8954.
- Sakmann, B., Patlak, J., and Neher, E. (1980). Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature* 286, 71–73.
- Sanders, R.D., Grover, V., Goulding, J., Godlee, A., Gurney, S., Snelgrove, R., Ma, D., Singh, S., Maze, M., and Hussell, T. (2015). Immune cell expression of GABAA receptors and the effects of diazepam on influenza infection. *Journal of Neuroimmunology* 282, 97–103.
- Sauguet, L., Howard, R.J., Malherbe, L., Lee, U.S., Corringer, P.-J., Harris, R.A., and Delarue, M. (2013a). Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nature Communications* 4, 1697.
- Sauguet, L., Poitevin, F., Murail, S., Van Renterghem, C., Moraga-Cid, G., Malherbe, L., Thompson, A.W., Koehl, P., Corringer, P.-J., Baaden, M., et al. (2013b). Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *EMBO J* 32, 728–741.
- Sauguet, L., Shahsavari, A., Poitevin, F., Huon, C., Menny, A., Nemecz, Á., Haouz, A., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., and Delarue, M. (2014a). Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 966–971.
- Sauguet, L., Shahsavari, A., and Delarue, M. (2014b). Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1850, 511–523.
- Saul, B., Kuner, T., Sobetzko, D., Brune, W., Hanefeld, F., Meinck, H.M., and Becker, C.M. (1999). Novel GLRA1 missense mutation (P250T) in dominant hyperekplexia defines an intracellular determinant of glycine receptor channel gating. *J Neurosci* 19, 869–877.
- Schmandt, N., Velisetty, P., Chalamalasetti, S.V., Stein, R.A., Bonner, R., Talley, L., Parker, M.D., Mchaourab, H.S., Yee, V.C., Lodowski, D.T., et al. (2015). A chimeric prokaryotic pentameric ligand-gated channel reveals distinct pathways of activation. *The Journal of General Physiology* 146, 323.
- Schmieden, V., Grenningloh, G., Schofield, P.R., and Betz, H. (1989). Functional expression in *Xenopus* oocytes of the strychnine binding 48 kd subunit of the glycine receptor. *EMBO J* 8, 695–700.
- Shan, Q., Nevin, S.T., Hadrill, J.L., and Lynch, J.W. (2003). Asymmetric contribution of alpha and beta subunits to the activation of alphabeta heteromeric glycine receptors. *Journal of Neurochemistry* 86, 498–507.
- Shingai, R., Yanagi, K., Fukushima, T., Sakata, K., and Ogurusu, T. (1996). Functional expression of GABA rho 3 receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Res* 26, 387–390.
- Sine, S.M. (2012). End-plate acetylcholine receptor: structure, mechanism, pharmacology, and disease. *Physiol Rev* 92, 1189–1234.
- Sivilotti, L.G. (2009). What single-channel analysis tells us of the activation mechanism of ligand-gated channels: the case of the glycine receptor. *The Journal of Physiology* 588, 45–58.
- Smart, O.S., Goodfellow, J.M., and Wallace, B.A. (1993). The pore dimensions of gramicidin A. *Biophysical Journal* 65, 2455–2460.
- Smart, T.G., Xie, X., and Krishek, B.J. (1994). Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol* 42, 393–441.
- Song, C., and Corry, B. (2009). Role of acetylcholine receptor domains in ion selectivity. *Biochim Biophys Acta* 1788, 1466–1473.
- Spurny, R., Billen, B., Howard, R.J., Brams, M., Debaveye, S., Price, K.L., Weston, D.A., Strelkov, S.V., Tytgat, J., Bertrand, S., et al. (2013). Multisite binding of a general anesthetic to the prokaryotic pentameric Erwinia chrysanthemi ligand-gated ion channel (ELIC). *J Biol Chem* 288, 8355–8364.
- Spurny, R., Debaveye, S., Farinha, A., Veys, K., Vos, A.M., Gossas, T., Atack, J., Bertrand, S., Bertrand, D., Danielson, U.H., et al. (2015). Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E2543–52.
- Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., Verheij, M., Legrand, P., Bertrand, D., Bertrand, S., et al. (2012). Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA* 109, E3028–34.
- Steinlein, O.K. (2012). Ion channel mutations in neuronal diseases: a genetics perspective. *Chemical Reviews* 112, 6334–6352.
- Séguéla, P., Wadiche, J., Dineley-Miller, K., Dani, J.A., and Patrick, J.W. (1993). Molecular cloning, functional properties, and distribution of rat brain alpha 7: a nicotinic cation channel highly permeable to calcium. *J Neurosci* 13, 596–604.
- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P.-J., and Changeux, J.-P. (2005). Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophysical Journal* 88, 3954–3965.

- Tasneem, A., Iyer, L.M., Jakobsson, E., and Aravind, L. (2004). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biol* 6, R4.
- Taylor, P., Talley, T.T., Radić, Z., Hansen, S.B., Hibbs, R.E., and Shi, J. (2007). Structure-guided drug design: conferring selectivity among neuronal nicotinic receptor and acetylcholine-binding protein subtypes. *Biochem Pharmacol* 74, 1164–1171.
- Thompson, A.J., Lester, H.A., and Lummis, S.C.R. (2010). The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly Reviews of Biophysics* 43, 449–499.
- Tillman, T.S., Seyoum, E., Mowrey, D.D., Xu, Y., and Tang, P. (2014). ELIC- $\alpha 7$ Nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) chimeras reveal a prominent role of the extracellular-transmembrane domain interface in allosteric modulation. *J Biol Chem* 289, 13851–13857.
- Toghraee, R., Papke, D., Cheng, X.-L., McCammon, J.A., Ravaoli, U., and Sine, S.M. (2009). Single-channel current through nicotinic receptor produced by closure of binding site C-loop. *Biophysical Journal* 96, 3582–3590.
- Tsetlin, V., Kuzmin, D., and Kasheverov, I. (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *Journal of Neurochemistry* 116, 734–741.
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* 346, 967–989.
- Velisetty, P., Chalamalasetti, S.V., and Chakrapani, S. (2012). Conformational transitions underlying pore opening and desensitization in membrane-embedded *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel (GLIC). *J Biol Chem* 287, 36864–36872.
- Vien, T.N., Modgil, A., Abramian, A.M., Jurd, R., Walker, J., Brandon, N.J., Terunuma, M., Rudolph, U., Maguire, J., Davies, P.A., et al. (2015). Compromising the phosphodependent regulation of the GABAAR $\beta 3$ subunit reproduces the core phenotypes of autism spectrum disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 14805–14810.
- Wang, Q., and Lynch, J.W. (2011). Activation and desensitization induce distinct conformational changes at the extracellular-transmembrane domain interface of the glycine receptor. *J Biol Chem* 286, 38814–38824.
- Weng, Y., Yang, L., Corringier, P.-J., and Sonner, J.M. (2009). Anesthetic sensitivity of the *Gloeobacter violaceus* proton-gated ion channel. *Anesthesia & Analgesia* 110, 59–63.
- Wessler, I., and Kirkpatrick, C.J. (2008). Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology* 154, 1558–1571.
- Wilson, G.G., and Karlin, A. (1998). The location of the gate in the acetylcholine receptor channel. *Neuron* 20, 1269–1281.
- Wooltorton, J.R., McDonald, B.J., Moss, S.J., and Smart, T.G. (1998). Identification of a Zn²⁺ binding site on the murine GABAA receptor complex: dependence on the second transmembrane domain of beta subunits. *The Journal of Physiology* 505 (Pt 3), 633–640.
- Xiu, X., Puskar, N.L., Shanata, J.A.P., Lester, H.A., and Dougherty, D.A. (2009). Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation- π interaction. *Nature* 458, 534–537.
- Yakel, J.L., Lagrutta, A., Adelman, J.P., and North, R.A. (1993). Single amino acid substitution affects desensitization of the 5-hydroxytryptamine type 3 receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 5030–5033.
- Yakel, J.L. (2013). Cholinergic receptors: functional role of nicotinic ACh receptors in brain circuits and disease. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 465, 441–450.
- Yamodo, I.H., Chiara, D.C., Cohen, J.B., and Miller, K.W. (2009). Conformational changes in the nicotinic acetylcholine receptor during gating and desensitization. *Biochemistry* 49, 156–165.
- Yevenes, G.E., Peoples, R.W., Tapia, J.C., Parodi, J., Soto, X., Olate, J., and Aguayo, L.G. (2003). Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci* 6, 819–824.
- Yip, G.M.S., Chen, Z.-W., Edge, C.J., Smith, E.H., Dickinson, R., Hohenester, E., Townsend, R.R., Fuchs, K., Sieghart, W., Evers, A.S., et al. (2013). A propofol binding site on mammalian GABAA receptors identified by photolabeling. *Nature Chemical Biology* 9, 715–720.
- Zhao, C., Xu, Z., Wang, F., Chen, J., Ng, S.-K., Wong, P.-W., Yu, Z., Pun, F.W., Ren, L., Lo, W.-S., et al. (2009). Alternative-splicing in the exon-10 region of GABA(A) receptor beta(2) subunit gene: relationships between novel isoforms and psychotic disorders. *PLoS ONE* 4, e6977.
- Zimmermann, I., and Dutzler, R. (2011). Ligand activation of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC. *PLoS Biol* 9, e1001101.
- Zouridakis, M., Giastas, P., Zarkadas, E., Chroni-Tzartou, D., Bregestovski, P., and Tzartos, S.J. (2014). Crystal structures of free and antagonist-bound states of human $\alpha 9$ nicotinic receptor extracellular domain. *Nat Struct Mol Biol* 21, 976–80.
- Zuber, B., and Unwin, N. (2013). Structure and superorganization of acetylcholine receptor-rapsyn complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 10622–10627.
- daCosta, C.J.B., Dey, L., Therien, J.P.D., and Baenziger, J.E. (2013). A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Chemical Biology* 9, 701–707.
- del Castillo, J., and Katz, B. (1955). On the localization of acetylcholine receptors. *The Journal of Physiology* 128, 157–181.

Article 3

« Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel
provide a mechanism for activation »

Ludovic Sauguet*, Azadeh Shahsavari*, Frédéric Poitevin*, Christèle Huon, Anaïs
Menny, Ákos Némecz, Ahmed Haouz, Jean-Pierre Changeux, Pierre-Jean Corringer,
and Marc Delarue

PNAS January 21, 2014

Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation

Ludovic Sauguet^{a,1}, Azadeh Shahsavari^{a,1,2}, Frédéric Poitevin^{a,1}, Christèle Huon^b, Anaïs Menny^b, Àkos Nemezc^b, Ahmed Haouz^c, Jean-Pierre Changeux^{d,e}, Pierre-Jean Corringer^b, and Marc Delarue^{a,3}

^aUnité de Dynamique Structurale des Macromolécules, Unité Mixte de Recherche (UMR) 3528 du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut Pasteur, 75015 Paris, France; ^bUnité Récepteurs-Canaux, UMR 3571 du CNRS, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; ^cPlateforme de Cristallogénèse, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; ^dUMR 3571 du CNRS, Institut Pasteur, 75015 Paris, France; and ^eCollege de France, 75005 Paris, France

Edited by Arthur Karlin, Columbia University College of Physicians and Surgeons, New York, NY, and approved November 22, 2013 (received for review August 8, 2013)

Pentameric ligand-gated ion channels mediate fast chemical transmission of nerve signals. The structure of a bacterial proton-gated homolog has been established in its open and locally closed conformations at acidic pH. Here we report its crystal structure at neutral pH, thereby providing the X-ray structures of the two end-points of the gating mechanism in the same pentameric ligand-gated ion channel. The large structural variability in the neutral pH structure observed in the four copies of the pentamer present in the asymmetric unit has been used to analyze the intrinsic fluctuations in this state, which are found to prefigure the transition to the open state. In the extracellular domain (ECD), a marked quaternary change is observed, involving both a twist and a blooming motion, and the pore in the transmembrane domain (TMD) is closed by an upper bend of helix M2 (as in locally closed form) and a kink of helix M1, both helices no longer interacting across adjacent subunits. On the tertiary level, detachment of inner and outer β sheets in the ECD reshapes two essential cavities at the ECD–ECD and ECD–TMD interfaces. The first one is the ligand-binding cavity; the other is close to a known divalent cation binding site in other pentameric ligand-gated ion channels. In addition, a different crystal form reveals that the locally closed and open conformations coexist as discrete ones at acidic pH. These structural results, together with site-directed mutagenesis, physiological recordings, and coarse-grained modeling, have been integrated to propose a model of the gating transition pathway.

X-ray crystallography | allostery | signal transduction | cys-loop receptor

Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) are a superfamily of membrane receptors that mediate fast chemical transmission of nerve signals in the central and peripheral nervous system (1). These allosteric receptors couple neurotransmitter (agonist) binding in the extracellular domain (ECD) to the opening of the ionic pore located in the transmembrane domain (TMD). There are two classes in pLGIC, with either cationic channels (acetylcholine — nAChR — and 5HT3 receptors) or anionic ones (glycine and GABA receptors). The molecular understanding of their allosteric transitions is a central issue in the pharmacology of pLGICs, as it would allow the rational design of novel orthosteric and allosteric ligands. Recently reported full-length structures of several prokaryotic and eukaryotic members of the family have provided significant insights into the conserved architecture of these receptors (2–5). Nevertheless, little is known about the structural events that link the binding/unbinding of agonist to the opening/closure of the channel gate. To understand the gating mechanism, the structures of the same receptor in different allosteric states are needed at atomic resolution. Here we report two crystal structures of wild-type GLIC, a proton-gated bacterial ion channel from *Gloeobacter violaceus* (6) at two different pHs, above and below pH₅₀.

GLIC structure was initially solved at acid pH in its open conformation (4), and later in a locally closed (LC) conformation (7) displayed by six different mutants with little variations. The LC conformation shares several structural features with the open

form but shows a closed pore as a result of a concerted bending of its M2 helices. Independently, recent progress has been made in understanding the structural mechanism of modulation by effectors such as general anesthetics (8) or ethanol (9) and the permeation process (10), using the same bacterial model system. Two other atomic X-ray structures of members of the pLGIC family have been described: an ion channel from the bacteria *Erwinia chrysantemi* (ELIC), in a closed pore conformation (2) and a eukaryotic glutamate-activated chloride channel (GluCl) in an open pore conformation similar to GLIC's (5). However, the lack of strong sequence identity between the available structures prevents us from reliably deriving a mechanism of the gating process because it is impossible to disentangle sequence effects from functionally relevant conformational changes.

Functional studies indicate that pLGIC can exist, in addition to an open and a resting form, in several closed forms, including desensitized and intermediate forms (11). In this study, we report a X-ray structure of GLIC at neutral pH in an apparently “closed/resting-state.” The resolution is moderate (4.35 Å), but noncrystallographic averaging over the four copies of the pentamer present in the asymmetric unit results in a much better electron density map than suggested by the nominal resolution. At this neutral pH the pore is closed by a tilt of the upper part of helix M2, as in the LC form, with an additional hinge movement of the beginning of helix M1. This is very different from what is

Significance

We describe the X-ray structures of the same pentameric ligand-gated ion channel (pLGIC) in both its liganded or ligand-free conformations. This provides the molecular basis for understanding the opening and closing (gating mechanism) of these key players in the fast transmission of chemical signals at synapses. As described with classical allosteric proteins, the tertiary changes of the subunits are linked together through the quaternary constraint by a marked reorganization of the interfaces between subunits and the associated binding pockets and cavities. The closed form displays a cavity that may allow a better understanding of the mechanism of action of pharmacological effectors of pentameric ligand-gated ion channels and the rational design of new modulators.

Author contributions: M.D. designed research; L.S., A.S., F.P., C.H., A.M., À.N., and A.H. performed research; L.S., A.S., F.P., P.-J.C., and M.D. analyzed data; and L.S., A.S., F.P., J.-P.C., and M.D. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Data deposition: The crystallography, atomic coordinates, and structure factors have been deposited in the Protein Data Bank, www.pdb.org (PDB ID codes 4NPP and 4NPQ).

¹L.S., A.S., and F.P. contributed equally to this work.

²Present address: Department of Drug Design and Pharmacology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, DK-2100 Copenhagen, Denmark.

³To whom correspondence should be addressed. E-mail: delarue@pasteur.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1314997111/-DCSupplemental.

seen in ELIC. At the same time, the ECD has undergone significant structural changes that lead to a profound rearrangement of both the ECD–ECD and ECD–TMD interfaces. Strikingly, the large structural variations observed in the four copies of the pentamer at pH 7 imply a rather flat energy landscape in the absence of ligand, whereas a crystal form grown at pH 4, also presented here, shows that the LC form coexists with the open form, thus suggesting an energy landscape made of two wells in the presence of the ligand.

Results

Structural Variability and Intrinsic Fluctuations at Neutral pH. To get structural information on the resting state of GLIC, crystals were grown at neutral pH, which initially diffracted to 8.5 Å. An elaborate dehydrating cryoprotection protocol and extensive screening of the resulting crystals allowed us to collect diffraction data at 4.35 Å (*SI Appendix, Table S1*). The crystals belong to the space group P2₁ with four pentamers (about 6,200 residues) in the asymmetric unit and a packing environment different from the one seen in the pH 4 structure (*SI Appendix, Fig. S1*). Noncrystallographic symmetry (NCS) averaging over the 20 chains in the asymmetric unit together with the use of B-factor sharpening (12) significantly improved the quality of the initial electron density map (Fig. 1*A* and *SI Appendix, Fig. S2*) and allowed the unambiguous reconstruction of the entire main chain of the receptor, except for six out of 20 loop C (*SI Appendix, Fig. S3*), and 65% of the side chains (Fig. 1*A*) with good refinement statistics (*SI Appendix, Table S1*).

We observe that the TMD has lower B factors than the ECD (*SI Appendix, Fig. S4*), which displays a large intrinsic structural flexibility (*Movie S1*) and significant deviations from C5 symmetry with a root-mean-square deviation (rmsd) of 1.2 ± 0.2 Å in the ECD compared with 0.2 Å in the TMD (*SI Appendix, Fig. S5*). The superimposition of the 20 different ECD structures of the pH 7 form shows that most of the variations on the tertiary level come from the loops: the $\beta 1$ – $\beta 2$ loop and the region between $\beta 2$ and $\beta 5$ (except for loop A), as well as $\beta 6$ – $\beta 7$ (Cys loop), $\beta 8$ – $\beta 9$ (loop F), and $\beta 9'$ – $\beta 10$ (loop C), are more flexible than the rest of the molecule (*SI Appendix, Fig. S6A*). However, the most striking differences between the four pentamers come from their quaternary structure: the rmsd between the six pairs of the four copies of the pH 7 pentamer is within 0.8–1.1 Å, much larger than the rmsd of the open (Protein Data Bank ID code 4HFI) pentamer rotated upon itself using C5 symmetry (0.25 Å). We will return to a more detailed analysis of these structural fluctuations and their functional significance after the description of the quaternary changes between the neutral and acidic pH forms.

Quaternary Changes Between pH 4 and 7 in the ECD. Compared with the open form, a concerted quaternary reorganization is observed in the ECD of the pH 7 structure, whereupon the separate monomeric domains have undergone rigid-body motions with respect to the C5 symmetry axis (*SI Appendix, Fig. S7A*). The ECD–ECD interface is reduced in the neutral pH conformation by about 180 Å² and the ECD–TMD interface by about 50 Å² (*SI Appendix, Table S2*). Meanwhile the solvent exposure is increased by about 80 Å² per monomer in the pore when it opens. The resulting effect is best described in terms of a differential radial (blooming) and tangential (twist) motions (Fig. 1*B* and *C*) at different heights above the membrane plane (*SI Appendix, Fig. S8A*). These motions are also revealed by coarse-grained Normal Mode Analysis (NMA) (*SI Appendix, Fig. S8B*): the third lowest frequency mode of the neutral pH form shows a combination of blooming and twist and accounts for 47% of the difference vectors between the two forms, whereas the pH 4 form has two separate modes (again twist and bloom, but separated) that account for, respectively, 22% and 25% of the transition. These modes have already been described as an important component of the allosteric transition of pLGICs, on the basis of NMA on only one form (13, 14) or by using ELIC as a model of the closed form (4). Here, however, the relative contribution of the blooming motion is markedly different. The remaining part of the

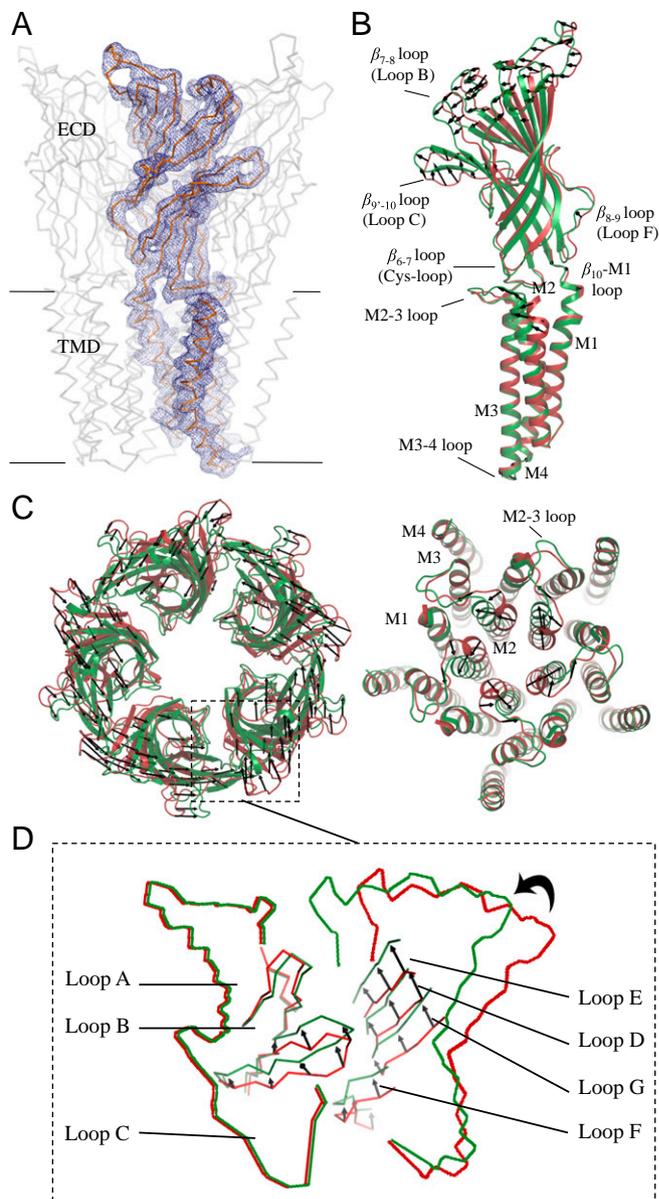


Fig. 1. Superimposition of the pH 4 and pH 7 GLIC structures. (*A*) The α trace of a full-length monomer of GLIC is represented in gray. The blue mesh is the 2mFo–DFc NCS-averaged electron density map contoured at a level of 1.5 σ . (*B*) Side view of a full-length monomer; superimposition of the open pH 4 (green) and closed pH 7 (red) GLIC structures; the black arrows show the direction of the motion observed from the closed form to the open form. (*C*) Upper view of ECDs. (*D*) Upper view of TMDs. (*E*) Enlarged view of the orthosteric agonist binding site at the interface.

transition is explained by more local modes of higher frequency that account for the closure of the pore (Fig. 1*B* and *D*).

Comparing each pair of adjacent monomers of the pH 7 GLIC structure after superimposition of only one monomer reveals that the position of the next-neighbor ECD monomers differ by 1.32 ± 0.6 Å (*SI Appendix, Fig. S9*) compared with 0.31 ± 0.16 Å in GLIC open state (pH 4), further illustrating the greater flexibility in the neutral pH structure than in the open structure of GLIC (*Movie S1*). This plasticity in the ECD–ECD interactions was already suggested by earlier studies on the isolated GLIC–ECD that crystallizes as a hexamer (15). Having at our disposal a structural ensemble composed of 20 different dimer interfaces, we asked whether the conformational changes of one monomer correlate with those of the neighboring subunit. Pair-wise cross-

correlation analysis reveals that the tip of loop C follows the rigid-body motion of the inner β sheet of the neighboring monomer, together with an interaction between the Cys loop and loop F (SI Appendix, Fig. S9). In the pH 4 form, loop C elicits more contacts with loop B of the same subunit than in the pH 7 form, through a network of interactions between the side chains of Arg77, Arg133, and Glu181 that is disrupted in the neutral pH form. Superimposition of the two dimers observed at pH 4 and pH 7 using all C-alpha atoms shows that the rearrangement of the interface of the orthosteric pocket (Fig. 1E) involves the sliding (translation) of the complementary subunit by about one interstrand distance, highlighting the importance of subunit interface plasticity in this allosteric transition. As a consequence, the change from pH 7 to pH 4 results in a constriction of the orthosteric pocket (SI Appendix, Fig. S10) and a better defined structure of loop C. To analyze the potential functional significance of the fluctuations in the neutral pH crystal form, we calculated the principal components (PCs) of the corresponding covariance matrix, averaged over the 20 monomers. We then projected the difference vectors between the acidic and neutral pH forms onto the first PC. For the subunit-subunit fluctuations, the first PC has an overlap of 0.88 with the quaternary transition in the ECD (SI Appendix, Fig. S11). This is consistent with a very powerful idea in statistical physics (16) that states that the fluctuations of an unperturbed system prefigure the response of this system to an external perturbation (here the binding of the ligand). Strikingly, we also found that the first PC of the monomer fluctuations in the pH 7 form has an overlap of 0.75 with the tertiary transition in the ECD. We now describe these tertiary transitions.

Tertiary Changes Between pH 4 and pH 7 in the ECD. Like other members of pLGICs and acetylcholine binding proteins (AChBPs), the ECD of GLIC adopts a highly conserved Ig-like β sandwich composed of an inner and an outer β sheet, whose connecting loops play a critical role in channel function (1). Concerning the loops, the rmsd of each neutral pH monomer with the acidic pH form (SI Appendix, Fig. S6B) indicates that both loop C and loop F significantly differ in the two forms, whereas differences in the β 1– β 2 loop and the region between β 2 and β 5 are less pronounced (Figs. 1B and 2A). This is consistent with the changes of both loop C and loop F occurring in the agonist-bound form, as described in both AChBP and other pLGICs (17, 18). In addition, there are some differences in the Cys loop and β 10–M1 (pre-M1) regions, which play a critical role at the ECD–TMD interface.

Compared with the open form, we observe a tertiary structural change of the outer β sheet (Fig. 2A) that is characterized by the loss of the hydrogen bonding pattern typical of a β strand in β 9' and β 10 strands, accompanied by a vertical shift of loop C (Fig. 2B). The relative movement of the inner and outer β sheets causes the loss of a conserved salt bridge between residues Asp32 in the β 1– β 2 loop and Arg192 in β 10–M1 loop, as well as a redistribution of the network of hydrophobic interactions between the β 1– β 2 loop, loop F, the pre-M1, and the Cys loop (Fig. 2C). The disruption of the D32–R192 salt bridge by site-directed mutagenesis has been shown to drastically reduce the open-closed probability of the channel in nAChR and other pLGICs (19, 20). The β sheet's movement was further analyzed to identify rigid body parts and the rotation axis that relates them (SI Appendix, Fig. S7B). It is necessary to distinguish between lower outer β sheet and the rest—namely, the upper outer β sheet and the inner β sheet. The rotation axis that describes their relative movement goes through the hydrophobic core of the ECD, reminiscent of, but not identical to the one determined by the superposition of alpha (ligand-bound) and nonalpha (unbound) subunit (s) structures obtained by cryo-EM on the muscle nAChR (21).

Upon rotation of the inner β sheet with respect to the lower outer β sheet, these two β sheets detach from each other, at the level of the ECD–TMD interface. This detachment creates a cavity involving 12 residues belonging to the Cys loop, the pre-M1, and loop F. These residues delineate a hydrophobic pocket in the core of the ECD (SI Appendix, Fig. S12), close to its interface with the TMD, and display a high level of conservation within the superfamily (22). In particular, the pocket is bordered on one side by two small hydrophobic residues, Cys27 and Leu30, and on the side of loop F (Leu157) by a larger aromatic residue, either a conserved Phe/Tyr in the anionic subfamily or Trp160 in the cationic one. Interestingly, the latter Trp residue is part of the conserved GEW sequence motif (SI Appendix, Fig. S13), which has been shown to be implicated in the binding of regulatory Ca^{2+} ions (23). Strikingly, this region has also been identified as a binding site for other regulatory divalent ions in ELIC (24), as well as a Bromoform molecule (25).

Changes in the TMD. In the pH 7 structure the radius of the transmembrane pore is not compatible with (hydrated) ion flow and is thus in a nonconductive conformation (SI Appendix, Fig. S14). This is due to a concerted bending of the upper part of the M2 helices of all five subunits that obstructs the pore by forming

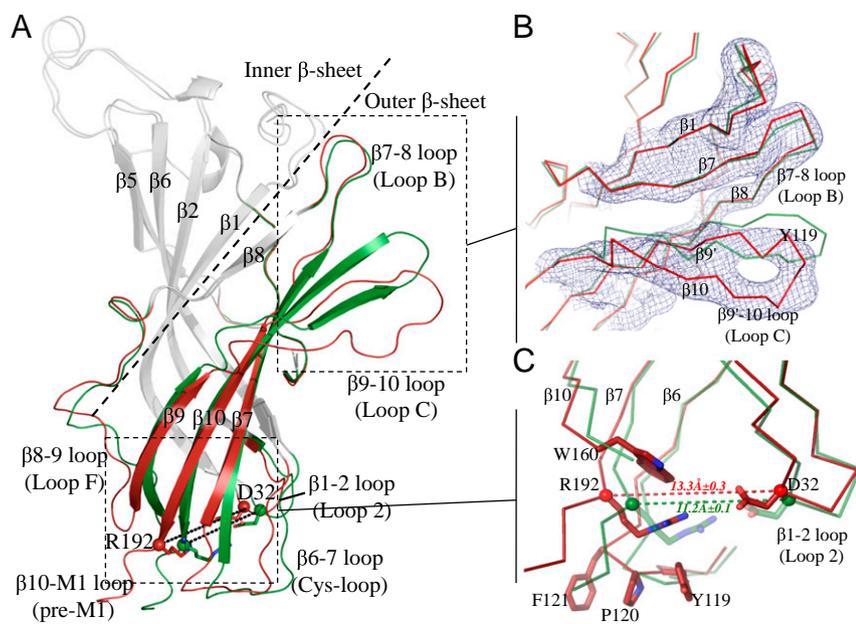


Fig. 2. Tertiary reorganization observed in an ECD monomer. (A) The structural elements that differ between the pH 4 and pH 7 ECD GLIC structures are shown in green for pH 4 and in red for pH 7 GLIC. Other parts of the structures are in gray. Residues Asp32 and Arg192 are shown as sticks. The dashed line delineates the inner and outer β sheets. (B) Enlarged view of the orthosteric agonist binding site illustrating the detachment of loop C from loop B. The blue mesh is the 2mFo–DFc NCS-averaged electron density map contoured at a level of 1.5 σ . (C) The interface between the ECD and the TMD at the level of the β 1– β 2, β 6– β 7, and β 10–M1 loops. The dashed line indicates the distance between the C α atoms of Asp32 and Arg192.

a tightly packed bundle, along with a revolving motion of the M2–3 loop that is similar to what is observed in the LC conformation (7) (Fig. 1D). However, there are some differences with the LC form, especially a 10° hinge motion of the N terminus of M1 occurring at the level of a conserved proline residue (Pro204 in GLIC). This hinge motion could be used, in conjunction with the rotation described above, as collective variables to analyze the transition pathway. In the pLGIC family this canonical proline in the top of M1 disrupts the normal α -helix hydrogen bonding network (26). The critical role of this portion of M1 in gating, along with M2, is supported by the role previously assigned to the main-chain carbonyl oxygen at position n-4 to this proline for binding allosteric modulators such as ivermectin in GluCl (5) and ethanol in GLIC (9). These movements of M1 and M2 result in a very different TMD–TMD interface, where now M2 helix interacts more closely with the other subunit through helix M1 rather than helix M2, in the open form (Fig. 1D and 4C).

Critical Residues at the ECD–TMD Interface. In the GLIC open conformation the C-terminal end of the M2–3 loop interacts with pre-M1 through hydrophobic interactions including side chains of Phe195 and Met252. These interactions are lost in the GLIC neutral pH structure due to the tilt of pre-M1 following the tertiary structural change in the ECD; in this process, Phe195 C α position changes, whereas Met252 does not (SI Appendix, Fig. S15). We tested the F195A mutant by electrophysiology and observed a marked loss of function, despite normal expression in the membrane, suggesting that this aromatic side chain contributes to the gating (Table 1 and SI Appendix, Fig. S16). The mutants Y194A and M252A are comparatively almost wild-type like (SI Appendix, Fig. S16 and Table 1).

In the open conformation Leu246 interacts with the ECD through a hydrophobic cleft formed by the side chains of Phe116 and Tyr119 from the β 6– β 7 loop and the backbone of the β 1– β 2 loop (upward binding mode), whereas it interacts with the TMD through a hydrophobic cleft formed upon the relative detachment of M2 and M3 helices in the neutral pH conformation (downward binding mode). We generated the L246A mutation and observed a striking loss-of-function, as expected (Table 1). It should be noted that this position is highly conserved within the family (SI Appendix, Fig. S13) and site-directed mutagenesis experiments performed on various pLGICs yield either strong gain or loss-of-function phenotypes (7).

The loss of the Asp32–Arg192 salt bridge in the pH 7 form, together with the redistribution of hydrophobic interactions between the β 1– β 2 loop, loop F, the pre-M1, and the β 6– β 7 loop (Cys loop), locally destabilize the β 1– β 2 and β 6– β 7 loops, thus discouraging the upward binding mode of Leu246. We performed two mutants to probe the importance of the D32–R192

interaction for stabilizing the open form: D32N has a significantly shifted pH₅₀, whereas the double-mutant D32N–R192Q has a marked loss-of-function (SI Appendix, Fig. S16 and Table 1).

Finally, there is a shift of the backbone in the loop F region that causes a change of environment for Leu157 from a hydrophobic one to a more exposed one. We thus constructed the mutant L157A and tested it by electrophysiology; a marked loss of function was observed, as predicted (SI Appendix, Fig. S16 and Table 1). Overall there is a very good agreement between the predicted phenotypes of the designed mutants and the observed ones.

Open and LC Forms of GLIC Coexist in Crystals at pH 4. GLIC fused to a C-terminal tag made of 10 histidines (GLIC_{His10}) was produced in insect cells, purified, and crystallized at pH 4. This resulted in a P2₁2₁2₁ crystal form (SI Appendix, Fig. S1), distinct from the previously described C2 crystal form that contains the open structure of GLIC (4), and this structure was solved at 3.35 Å resolution (SI Appendix, Table S1). Surprisingly, the electron density reveals that both the open and the LC conformations coexist in the unit cell (Fig. 3A). Indeed, neither the open form alone nor the LC form alone fully satisfied the diffraction data, as strong peaks in the Fourier difference map clearly indicated the occurrence of more than one conformation of the upper half of M2 helices and the M2–M3 loops (SI Appendix, Fig. S17). After incorporation of these two alternative conformations in the model, it was found they were sufficient to explain the data (there was no unexplained density left in the Fo–Fc map). In a homopentamer, the LC and open forms are exclusive from each other, as neighboring chains displaying different (open and LC) conformations would sterically clash. It is therefore likely that the crystal contains a mixture of pentamers adopting either the open or the LC conformations.

To summarize, the unique structure of GLIC at low pH with the LC and open forms coexisting as discrete forms in a crystal suggests that both conformations are in equilibrium when the ECD is in an agonist-bound conformation, displaying fluctuations that are significantly different in nature from the ones observed in the resting state (Fig. 3B).

Gating Transition Pathway: A Plausible Model. Previous attempts to model the gating transition assume that ELIC is a good model for the resting form of GLIC (27–29). Here we provide a model based on the crystal structure of the two end points of the transition of the same pLGIC. To generate physically plausible trajectories we used iENM (30), a coarse-grained method based on a simplified energy landscape with two harmonic wells centered on the start and end points of the transition. It was found to predict the expected sequence of structural events on hemoglobin (31). It was used here to generate plausible coarse-grained (CA atoms only) trajectories between GLIC_{pH7}, GLIC_{LC}, and GLIC_{Open} (Movies S2 and S3). Analysis of these trajectories reveals that the conformational changes at the tertiary and quaternary level happen roughly at the same pace (SI Appendix, Fig. S18A): the ECD transitions first, and the TMD follows (SI Appendix, Fig. S18B). Three main events can be distinguished, involving the sequential transition of three groups: (i) the inner and outer β sheets, most of their connecting loops, and the pre-M1; (ii) the Cys loop, loop M2–3, and the most extracellular part of the transmembrane helices; and (iii) the rest of the TMD located below the level of the conserved Proline in M1. The corresponding motions—in the reference frame of the full-length pentamer—are (i) an unblooming of the ECD, whose amplitude decreases as the twisting motion increases, resulting in the reshaping of the ECD–ECD interfaces; (ii) initiation of channel opening at the level of the hydrophobic gate in the transmembrane pore; and (iii) rigid-body rotation of the TMD, corresponding to the end of the twisting motion (Fig. 4).

When transitions from GLIC_{pH7} toward either GLIC_{LC} or GLIC_{Open} are compared, they appear to share the same initial conformational changes (SI Appendix, Fig. S18C): it is only when the ECD has experienced about 70% of its transition that both trajectories split apart and the TMD either stays closed or opens up. The

Table 1. Electrophysiology of GLIC mutants, showing the pH₅₀, Hill-slope (n_H), and lower and upper bound of I_{max} found for n replicate oocytes (measured from at least three separate injections)

Construct	pH ₅₀	n _H	I _{max} , μ A	n
GLIC WT	5.3 \pm 0.2	1.29 \pm 0.06	–1.8 <> –7.5	7
D32E	4.6 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2	–0.4 <> –1.1	4
D32N	\leq 4.0	2 \pm 0.6	–0.4 <> –1.7	7
D32N/R192Q	ND	ND	–0.2 <> –0.3	4
L157A	ND	ND	–0.1 <> –0.2	4
Y194A	5.2 \pm 0.3	1.7 \pm 0.3	–3.7 <> –7.8	4
F195A	ND	ND	–0.4 <> –1.0	3
L246A	ND	ND	–0.1 <> –0.3	3
M252A	5.3 \pm 0.4	1.2 \pm 0.2	–1.9 <> –7.8	4

ND represents nondeterminable pH₅₀ as currents only appeared at pH 4, usually with very low amplitudes, and no dose–response curve could be recorded. Because fits for D32N did not plateau and resulted in many incomplete curves, the pH₅₀ is not certain at 4.0 \pm 0.1 and listed as \leq 4.0.

tilting of the top of helix M2 was also invoked in a recent paper as the primary mechanism for the closure of the pore (36), in a manner similar to what we observe in the neutral pH form of GLIC. Therefore, we conclude that the neutral pH GLIC structure presented here possesses all of the structural features expected from the resting-state form. We stress that the closure of the pore in GLIC pH 7 is different from the one observed in ELIC in which M2 and M3 move as a block and M4 appears decoupled from the rest of the TMD. Actually, agonist binding in ELIC is accompanied by no significant structural change (38, 39), as would be expected for a desensitized form. Further studies will be needed to see if a crystal structure of GLIC can also be solved in such a conformation.

We note that other known allosteric systems (40), including membrane receptors (41) also display a marked structural flexibility in the resting state and that some models of the voltage-gated ion channels postulate diffusion in a flat energy landscape for this form (42). In the large-scale allosteric transition of adenylate kinase, it was recently found that the conformational basin of the closed form is much larger than previously assumed and wider than in the open state (43), as inferred here (Fig. 3). This would also imply a large entropy in the number of pre-existing transition pathways, which was predicted to lower the free-energy barrier of allosteric transitions (44). Furthermore, the analysis of the trends of the fluctuations of the resting forms

in GLIC explains a large part of the transition toward the open form, as predicted by linear response theory (16). On the other hand, the coexistence of the LC and open forms in the same crystal as discrete states fits well with the allosteric scheme postulated long ago for these receptors (1, 45). Here we provide a plausible pathway based on a coarse-grained model (30). More detailed models of the transition using all-atoms models will be needed to understand the exact role of pH in the transition and will be reported elsewhere. The validation of these possible pathways will require experimental data such as those available on nAChR (32).

Materials and Methods

GLIC and GLIC^{His10} were expressed and purified as in ref. 8. Crystals underwent a special dehydration protocol before cryocooling. Electrophysiology recordings were performed by expressing GLIC and its variants in *Xenopus laevis* oocytes as in ref. 10. Full methods are provided in *SI Appendix*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank L. Malherbe for preparing some of the mutants. We thank J. Gouge for help in data collection, M. Prevost for sharing data on mutants, and G. Bricogne (Global Phasing) for sharing expertise on refinement in Buster. We thank the Platform for Protein Expression of the Proteopole in the Institut Pasteur (respectively, J. Bellalou and S. Petres) as well as the staff of synchrotron beamlines in both ESRF (Grenoble) and Soleil (Orsay). We gratefully acknowledge the financial support of ANR (Grant NicoChimera) and DARRI (Institut Pasteur). L.S. was funded by a postdoctoral Roux fellowship.

- Corringer PJ, et al. (2012) Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: From bacteria to brain. *Structure* 20(6):941–956.
- Hilf RJ, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452(7185):375–379.
- Hilf RJ, Dutzler R (2009) Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457(7225):115–118.
- Bocquet N, et al. (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457(7225):111–114.
- Hibbs RE, Gouaux E (2011) Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474(7349):54–60.
- Bocquet N, et al. (2007) A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445(7123):116–119.
- Prevost MS, et al. (2012) A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 19(6):642–649.
- Nury H, et al. (2011) X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469(7330):428–431.
- Sauguet L, et al. (2013) Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nat Commun* 4:1697.
- Sauguet L, et al. (2013) Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *EMBO J* 32(5):728–741.
- Lape R, Plested AJ, Moroni M, Colquhoun D, Sivilotti LG (2012) The α 1K276E startle disease mutation reveals multiple intermediate states in the gating of glycine receptors. *J Neurosci* 32(4):1336–1352.
- Nicholls RA, Long F, Murshudov GN (2012) Low-resolution refinement tools in REFMAC5. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 4):404–417.
- Bertaccini EJ, Lindahl E, Sixma T, Trudell JR (2008) Effect of cobratoxin binding on the normal mode vibration within acetylcholine binding protein. *J Chem Inf Model* 48(4):855–860.
- Taly A, et al. (2005) Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophys J* 88(6):3954–3965.
- Nury H, et al. (2010) Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel. *J Mol Biol* 395(5):1114–1127.
- Ikeguchi M, Ueno J, Sato M, Kidera A (2005) Protein structural change upon ligand binding: Linear response theory. *Phys Rev Lett* 94(7):078102.
- Hansen SB, et al. (2005) Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO J* 24(20):3635–3646.
- Bourne Y, et al. (2010) Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(13):6076–6081.
- Lee WY, Sine SM (2005) Principal pathway coupling agonist binding to channel gating in nicotinic receptors. *Nature* 438(7065):243–247.
- Purohit P, Auerbach A (2007) Acetylcholine receptor gating at extracellular transmembrane domain interface: The “pre-M1” linker. *J Gen Physiol* 130(6):559–568.
- Unwin N (2005) Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J Mol Biol* 346(4):967–989.
- Dellisanti CD, Hanson SM, Chen L, Czajkowski C (2011) Packing of the extracellular domain hydrophobic core has evolved to facilitate pentameric ligand-gated ion channel function. *J Biol Chem* 286(5):3658–3670.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D (1996) Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *EMBO J* 15(21):5824–5832.
- Zimmermann I, Marabelli A, Bertozzi C, Sivilotti LG, Dutzler R (2012) Inhibition of the prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel ELIC by divalent cations. *PLoS Biol* 10(11):e1001429.
- Spurny R, et al. (2013) Multisite binding of a general anesthetic to the prokaryotic pentameric *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel (ELIC). *J Biol Chem* 288(12):8355–8364.
- England PM, Zhang Y, Dougherty DA, Lester HA (1999) Backbone mutations in transmembrane domains of a ligand-gated ion channel: implications for the mechanism of gating. *Cell* 96(1):89–98.
- Nury H, et al. (2010) One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(14):6275–6280.
- Calimet N, et al. (2013) From the cover: A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(42):E3987–E3996.
- Zheng W, Auerbach A (2011) Decrypting the sequence of structural events during the gating transition of pentameric ligand-gated ion channels based on an interpolated elastic network model. *PLoS Comput Biol* 7(1):e1001046.
- Tekpinar M, Zheng W (2010) Predicting order of conformational changes during protein conformational transitions using an interpolated elastic network model. *Proteins* 78(11):2469–2481.
- Tekpinar M, Zheng W (2013) Coarse-grained and all-atom modeling of structural states and transitions in hemoglobin. *Proteins* 81(2):240–252.
- Auerbach A (2012) Thinking in cycles: MWC is a good model for acetylcholine receptor-channels. *J Physiol* 590(Pt 1):93–98.
- Celie PH, et al. (2004) Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41(6):907–914.
- Zhu F, Hummer G (2010) Pore opening and closing of a pentameric ligand-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(46):19814–19819.
- Parikh RB, Bali M, Akabas MH (2011) Structure of the M2 transmembrane segment of GLIC, a prokaryotic Cys loop receptor homologue from *Gloeobacter violaceus*, probed by substituted cysteine accessibility. *J Biol Chem* 286(16):14098–14109.
- Velisetty P, Chalamalasetti SV, Chakrapani S (2012) Conformational transitions underlying pore opening and desensitization in membrane-embedded *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel (GLIC). *J Biol Chem* 287(44):36864–36872.
- Velisetty P, Chakrapani S (2012) Desensitization mechanism in prokaryotic ligand-gated ion channel. *J Biol Chem* 287(22):18467–18477.
- Spurny R, et al. (2012) Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(44):E3028–E3034.
- Gonzalez-Gutierrez G, et al. (2012) Mutations that stabilize the open state of the *Erwinia chrysanthemi* ligand-gated ion channel fail to change the conformation of the pore domain in crystals. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(16):6331–6336.
- Velyvis A, Yang YR, Schachman HK, Kay LE (2007) A solution NMR study showing that active site ligands and nucleotides directly perturb the allosteric equilibrium in aspartate transcarbamoylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(21):8815–8820.
- Granier S, Kobilka B (2012) A new era of GPCR structural and chemical biology. *Nat Chem Biol* 8(8):670–673.
- Goychuk I, Hänggi P (2002) Ion channel gating: A first-passage time analysis of the Kramers type. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(6):3552–3556.
- Potayan DA, Zhuravlev PI, Pappoian GA (2012) Computing free energy of a large-scale allosteric transition in adenylate kinase using all atom explicit solvent simulations. *J Phys Chem B* 116(5):1709–1715.
- Itoh K, Sasai M (2010) Entropic mechanism of large fluctuation in allosteric transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(17):7775–7780.
- Changeux JP (2013) 50 years of allosteric interactions: The twists and turns of the models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(12):819–829.

Materials & Methods

Protein production

GLIC fused to maltose-binding protein was expressed in *E. coli* C43 cells and purified according to a protocol described previously(1). GLIC_{His10}: the cDNA coding for GLIC was fused to a C-terminal his-tag and inserted into a pMT/BiP/V5-HisA vector (Invitrogen). The vector and the pPURO selection-plasmid (20 µg and 1 µg, respectively) were co-transfected into S2-type insect cells in the presence of lipofectin (Invitrogen). Co-transfected cell-lines were grown in Insect-XPRESS medium (Lonza) supplemented with 0.6 mg/ml puromycin at 28°C without CO₂. Cell-lines were considered stable after 3-4 weeks. Protein expression was induced upon the addition of 5 mM CdCl₂ when the culture reaches a cell-density population of 10⁷ cells/ml. Cells were recovered by centrifugation (1500 g for 10 min). GLIC_{His10} was extracted and purified following the same procedure as described previously(1) with the difference that the Amylose-column affinity chromatography purification step was substituted by a Nickel-NTA-column pseudo-affinity chromatography purification step.

Crystallography

Crystal preparation

All crystals were obtained using vapour diffusion in hanging drops at 20°C.

a) GLIC_{His10} crystallized in an LC-open equilibrium: the concentrated (6–8 mg/ml) protein was mixed in a 1:1 ratio with reservoir solution typically containing 15–20% PEG 2000MME, 50 mM NiCl₂, and 0.1 M NaAcetate pH 4.0. Crystallization was induced by the micro-seeding technique from a solution of crushed crystals 1 hour after setting up the crystallization experiment. Crystals appeared overnight in a parallelepiped-like shape and grew for one week before reaching their final dimensions (typically 200 µm x 200 µm x 100 µm).

b) GLIC crystallized at neutral pH: the concentrated (10 mg/ml) protein was mixed in a 1:1 ratio with reservoir solution typically containing 13–15% PEG 4000, 200 mM KSCN, 10 mM CaCl₂, 3% Trimethylamine-N-oxide dihydrate and 0.1 M NaHepes pH 7.5. Crystallization was induced by the micro-seeding technique from a solution of crushed crystals 1 hour after setting up the crystallization experiment. Crystals appeared overnight in a plate shape and grew for 10 to 30 days before reaching their final dimensions (typically 300 µm x 300 µm x 50 µm for the best crystals). All crystals were cryo-protected using a three-steps protocol. 1) The crystals-containing drops were transferred to the cold room (4°C), sealed onto a novel crystal plate that contained no reservoir solution and left at 4°C for 10 minutes. 2) 3-5 µl of a dehydrating solution composed of the reservoir solution supplemented with 18% of ethylene glycol was added to the crystallization drop. 3) The drop was left to air-dry for 10-40 minutes prior to flash-freezing in liquid nitrogen (10-20 crystals were frozen within 10-40 minutes). The dehydration protocol proved crucial in improving the resolution. Systematic screening of hundreds of crystals led to several data sets extending to 4.5-4.6 Å; the best one, reaching 4.35 Å, is presented here.

Data collection

Datasets were collected on beamline Proxima-I of the Soleil Synchrotron (Gif-sur-Yvette, France) and on beamline ID23-1 of the European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, France). Data collection required an extensive screening as one crystal out of about one hundred diffracted well enough for the GLIC_{His10} crystals and one out of one thousand for the GLIC pH 7 structure. Crystals were collected using the helicoïdal data collection facility. Reflections were integrated using XDS(2) and further processed using the CCP4 programs(3).

Crystals of GLIC_{His10} belong to the P2₁2₁2₁ space group (a,b,c=113.5 Å, 127.6 Å, 185.8 Å and $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$) with one pentamer in the asymmetric unit. Crystals of GLIC at neutral pH belong to the P2₁ space group (a,b,c=131.5 Å, 384.1 Å, 148.4 Å and $\alpha,\beta,\gamma=90^\circ,98.5^\circ,90^\circ$) with four pentamers in the asymmetric unit. Details on the data collection statistics are provided in the **Supplementary Table 1**.

Phasing and refinement

GLIC pH7 structure: *i) Phasing & initial model-building.* The molecular replacement solution was found with Phaser (4) by using the structure of GLIC (PDB 4HFI) at 2.4 Å as a starting model. The asymmetric unit was found to be composed of four individual pentamers. This initial model was refined in Refmac5 (5) by using rigid-body refinement and subsequently, by using restrained refinement with the Jelly-body option (5). The resulting model was improved by manual building in COOT (6). *ii) NCS refinement.* Already at early stages of refinement, it appeared that the GLIC pH7 structure significantly deviated from the C5-symmetry (**Suppl. Figure S5**). In addition, the four pentamers that compose the asymmetric unit are markedly different from each other. Automatically-generated non-crystallographic symmetry restraints were thus used throughout refinement (7). The algorithm used to impose NCS dynamically detects those regions that are superimposable and those that are not and should be left independent. One might ask if strict NCS should not be used when refining a structure at 4.35 Å resolution. Numerous controls were performed to document that point. In particular, we observed that imposing strict NCS during refinement resulted with at least one ECD per pentamer being moved out of the electron density (**Supplementary Figure S5**). This observation was also true when looking at the Fo-Fc map obtained by omitting selected regions of the structure (**Supplementary Figure S5**). To make sure that deviations from NCS were real, either the C5 symmetry in each pentamer or from one pentamer to the other, we performed a number of tests using either calculated or experimental data at a resolution of 4.6 Å and different starting models, similar to the ones described here (involving either GLIC or ELIC). This showed unambiguously that Refmac5 is able to pick up deviations from NCS similar to the ones described here, even at a modest resolution, deliberately set at a conservative estimate of the resolution where $I/\sigma(I) > 2$ (4.6 Å). *iii) B-factor refinement.* Right after molecular replacement, B-factors were reset to an arbitrary value of 200 Å² corresponding to the Wilson-plot estimated B-factors and set constant until the final steps of refinement. B-factors were then refined using 2 TLS parameter by chain (one for the ECD, one for the TMD). In order to prevent over-refinement, atomic positions were set constant during B-factor refinement. *iv) Quality of the electron density:* Despite the moderate resolution, NCS symmetry averaging improves the quality of the electron density sufficiently to allow the unambiguous reconstruction of the main chain except for the tip of Loop C in chains H, I, K, L, M and S that were omitted from the model. For all main chain atoms, whose positions are at the basis of all our results, the real space correlation coefficient is very good (**Supplementary Figure S3**). In addition, it was possible to build side chains in the TMD and in the most ordered regions of the ECD. The quality of the electron density is unequal from one pentamer to the other. The pentamer for which the electron density allowed reconstruction of the greatest number of side chains comprises chains A, B, C, D and E. Side chains positions for which the electron density was absent were omitted from the model. *v) Refinement validation:* After refinement Rfactor and R-free were found to be almost identical 0.240/0.244. This might be due to the 20 NCS-related copies used throughout refinement. Indeed, when using a high NCS-related number of copies, test-set reflection might come close in the reciprocal space to “NCS-related” working-set reflections, thus resulting in an artificially low R-free. As a control we performed refinement using a test set that includes an R-free reflection set of 10% randomly selected reflections instead of 5%. As expected, the

refinement statistics were similar as well as the resulting model. In addition, we checked that when selected regions of the proteins were omitted in all 20 chains the model nicely fit into the Fourier difference electron density maps. A representative figure of one of these controls is shown in **Supplementary Figure S5**. *vi) Final round of refinement* The model was finally refined in Buster (8) using targeted refinement against the 2.4 Å resolution GLIC open structure (1) in order to improve the geometry of the model. *vii) Model geometry validation:* 94% of the residues were in the most favoured regions of the Ramachandran plot. MolProbity scores (9) for the refined model ranged within the 100th percentiles of structures refined at a comparable resolution. Details of the refinement statistics are provided in **Supplementary Table 1**. *viii) Estimation of the error in the coordinates:* the error in the coordinates of the model was calculated using a formula due to Cruickshank (Acta Cryst, 1999, 55:583-601) that involves the R-factor, the parameters-to-data ratio, the data completeness, the resolution and the number of copies used to perform NCS averaging, which can be retrieved from Buster output. We found on the average an error of 0.26 +/- 0.05 Å in the ECD and 0.25 +/- 0.01 Å in the TMD. This is however only an estimate of the error, as it assumes NCS constraints instead of NCS restraints.

GLIC_{His10} crystallized in an LC-open equilibrium : The GLIC_{His10} structure was solved by molecular replacement using the structure of GLIC (PDB 4HFI) at 2.4 Å as a starting model. Molecular replacement solution was obtained using Phaser (4). The resulting model refinement using Buster (8). Automatically-generated non-crystallographic symmetry restraints were used throughout refinement. The electron density revealed that both the open and LC conformations co-exist in the unit cell. Indeed, neither the open and LC conformations fully satisfied the diffraction data as strong peaks in the Fourier difference map clearly indicated the occurrence of more than one conformation in a region of the protein encompassing the top half of M2 and the M2-M3 loop (**Supplementary Figure S17B, S17C**). After modeling of these two alternative conformations in a region that comprises residue 233 to 253, there was no unexplained density left after refinement (**Supplementary Figure S17A**). The relative occupancies of these two conformations was refined in Buster and suggested that both conformations have a relative occupancy of 0.5. 96% of the residues were in the most favoured regions of the Ramachandran plot. MolProbity scores(9) for the refined models all ranged within the 100th percentiles of structures refined at comparable resolutions. Details of the refinement statistics are provided in **Supplementary Table 1**. In the ECD, five blobs of electron density were assigned to Ni⁺⁺ that is present in the crystallization solution at a concentration of 50 mM. The Ni⁺⁺ binding sites are located at the level of the side chains of residues Asp 86 and Asp 88, a position that was previously shown to bind Cs⁺(1).

In silico methods

Deviation to 5-fold symmetry

After alignment of the principal axis of inertia of the pentameric TMD with the z-axis, the deviations to the five-fold symmetry for a subset of residues was evaluated as follows:

The subset of atoms belonging to chain i, for i running from 1 to 4, is rotated clockwise around the C5 symmetry axis by the angle $(j-i) \cdot (2\pi/5)$, where j runs from i+1 to 5, and the RMSD between the rotated subset and its image in chain j is stored. The RMSD averaged over all ten pairs (i,j) of the pentamer yields the deviation to the 5-fold symmetry.

Semi-Rigid Body Analysis

The relative translation-rotation displacement from the mean structure of GLIC at neutral pH to the mean structure in an open conformation was quantified based on the displacement of two different rigid bodies, the lower and the upper ones, identified using a combination of automatic tools (10) and manual adjustments. The lower rigid bodies encompasses the C-alpha of residues belonging to strand $\beta 7$ (122 to 127), $\beta 9$ (162 to 165) and $\beta 10$ (186 to 191). It is referred to as the 'outer β -sheet' in the main text, although it only consists of the most cytoplasmic moiety of this β -sheet. The upper rigid body is made of all the other C-alphas of the ECD. It is referred to as the 'inner β -sheet' in the text although it consists of the actual inner β -sheet and the remaining, most extracellular, moiety of the outer β -sheet and loops.

The motion experienced by these rigid bodies were analysed in the context of all 20 dimers of ECD (extracted from the four copies of GLIC obtained at neutral pH) superimposed on the lower rigid body of the principal subunit. The motion of both the inner β -sheet of the principal subunit and the outer β -sheet from the complementary subunit with respect to the outer β -sheet of the principal subunit were quantified in order to describe, respectively, the tertiary and quaternary deformations at stake.

The translational part of this displacement was measured as the distance between the center of mass of the same body in the two conformations, whereas the rotational one was described by a rotation axis and the rotation angle around this axis. The latter are extracted as follows:

The 3*3 covariance matrix H between the cartesian coordinates α and β (α being either x, y or z) sampled by the N atoms of the two structures (A) and (B) under study is defined as:

$$H_{\alpha\beta} = \sum_{i=1}^N \left(\vec{r}_{i,\alpha}^{(A)} - \langle \vec{r}_{i,\alpha}^{(A)} \rangle \right) \cdot \left(\vec{r}_{i,\beta}^{(B)} - \langle \vec{r}_{i,\beta}^{(B)} \rangle \right)$$

Singular value decomposition (SVD) of H allows to rewrite H as the product of three matrices, U , S and V , with U and V the left and right eigenvectors and S the diagonal matrix containing the singular values of $H=USV^T$.

The rotation matrix that relates structures (A) to (B) is then computed as $R=VU^T$ and yields the rotation axis and the rotation angle around this axis.

Projection on cylindrical coordinates

After aligning the principal axis of inertia of a pentameric GLIC with the z-axis, and further aligning all structures under study on their most cytoplasmic TMD part, five copies of each pentamer are generated and rotated so that all subunits (20 from GLIC pH 7 and 5 from GLIC pH 4) are superimposed. Each subunit is then cut into 20 slices in the z-direction, and the center of mass of each slice is computed. The altitude (z), the distance to the symmetry axis and the polar angle in the plane perpendicular to the symmetry axis are then extracted, yielding the coordinates of each slice from each subunit in a cylindrical reference frame.

Normal Mode Analysis

An Elastic Network Model (ENM) is built, at the C-alpha level of description, for each structure under study. Pairwise interactions between the N residues are modelled by harmonic springs of the same force constant when the distance between their C-alphas is inferior to a given cut-off (10 Å). The $3N*3N$ matrix of second derivatives, or Hessian matrix, of the resulting elastic energy is diagonalized (using the NOMAD-Ref web server(11)) to yield an

orthonormal basis of $3N$ vectors (of size $3N$), the normal modes, whose associated eigenvalues are related to their vibrational frequencies. The first 6 normal modes correspond to rigid-body translation-rotation motions of the whole structure, and are thus discarded. The following modes are ranked in order of increasing frequency. The lowest frequency modes are often associated to collective motions of residues throughout the structure, while higher frequency modes correspond to more local vibrations(12).

The overlap between a given normal mode and a given difference vector, joining the structure from which the mode is derived to another structure of the same molecule, is calculated as the normalized scalar product between the two vectors. Its absolute value is thus bounded on [0:1] and quantifies to which extent a given mode is representative of the conformational changes from one structure to the other.

Correlations of fluctuations between adjacent monomers and pair-wise cross-correlations analysis

The ECD-ECD dimer interfaces of GLIC pH 7 structure were superimposed on the ECD of their principal subunit. Since all $C\alpha$ could not be built in 6 out of the 20 loops C, the 14 remaining interfaces were analysed. The pair-wise cross-correlations between the $C\alpha$ atoms fluctuations of one subunit and those of its immediate neighbour were calculated as:

$$C_{ij} = \frac{\langle (\langle \vec{r}_i - \langle \vec{r}_i \rangle \rangle) \cdot (\langle \vec{r}_j - \langle \vec{r}_j \rangle \rangle) \rangle}{\sqrt{(\langle \langle \vec{r}_i \rangle^2 \rangle - \langle \vec{r}_i \rangle^2)(\langle \langle \vec{r}_j \rangle^2 \rangle - \langle \vec{r}_j \rangle^2)}}$$

C_{ij} is the (Pearson) cross-correlation between the $C\alpha$ atoms of the residues i and j ; r_i is the coordinates of a given $C\alpha$ atom of a residue at one monomer and r_j is the $C\alpha$ coordinates at the second monomer of the dimer. Only cross-correlations between $C\alpha$ separated, in average, by less than 10 Å were considered. Averages were taken over the 14 monomers.

Principal Component Analysis of fluctuations

For a matrix X containing the cartesian coordinates of N atoms from m structures centered on their mean position (with size $m*3N$), the $3N*3N$ covariance matrix C is defined as $C=X^T X$, where the superscript T refers to matrix transposition. The principal component analysis (PCA) of C yields vectors defining orthogonal directions of decreasing variance. These eigenvectors are referred to as principal components, and can be obtained by singular value decomposition (SVD) of X . The 1st component corresponds to the vector with the highest singular value, and represents the direction that contains most of the variability in the fluctuations of X .

In practice, the PCA of the two rigid bodies defined in the 'semi-rigid body analysis' paragraph above was performed in order to describe the variability within the four copies of the GLIC pH 7 structure, at the tertiary and quaternary level.

The fluctuations experienced by these rigid bodies were analysed in the context of all 20 dimers of ECD (extracted from the four copies of GLIC obtained at neutral pH) superimposed on the lower rigid body of the principal subunit. Two matrices X were subjected to PCA, the first one contains all copies of the upper rigid body from the principal subunit and describes most of the tertiary deformations in the ECD. The second contains all copies of the lower rigid body from the complementary subunit and describes most of the quaternary

deformations. The overlap between the first 10 components of the PCA and the difference vectors between the two forms was calculated as in (12).

iENM trajectory Setup and Analysis

The web server iENM (<http://enm.lobos.nih.gov>) was used to generate plausible trajectories between the four copies of GLIC obtained at neutral pH - GLIC_{pH7}, the open structure of GLIC - GLIC_{open} (PDB ID: 4HFI), and the locally-closed form of GLIC (H11'F mutant, PDB ID: 3TLT), at the C-alpha level of description. In addition to trajectories, the program outputs a $f_{progress}$ parameter for each residue, quantifying the relative time at which this residues has experienced half of its transition(13).

The trajectories were mapped onto different reaction coordinates (RCs), as in (14). These reaction coordinates are defined, for a subset S of residues taken in the n^{th} snapshot of the trajectory, as:

$$RC_n^{(S)} = \frac{\left(\vec{r}_n^{(S)} - \vec{r}_{start}^{(S)}\right) \cdot \left(\vec{r}_{end}^{(S)} - \vec{r}_{start}^{(S)}\right)}{\left\|\vec{r}_{end}^{(S)} - \vec{r}_{start}^{(S)}\right\|^2}$$

The subsets used are:

- monomer: residues 5 to 315 from one chain
- pentamer: residues 5 to 315 from the five chains
- ECD: residues 5 to 190 from the five chains
- TMD: residues 191 to 315 from the five chains

All figures and movies were made with Pymol Molecular Graphics System (Version 1.5.04 Schrödinger, LLC) and FFmpeg (www.ffmpeg.org). Tables and plots were made using the free software Plot and Gnuplot. Pore radii were calculated using the program Hole(15).

Electrophysiology and expression tests

Electrophysiology

Xenopus ovary fragments were obtained from the Centre de Ressources Biologiques-Rennes. Injected oocytes were kept in modified Barth's medium (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2.5 mM NaHCO₃, 5 mM HEPES, 0.7 mM CaCl₂ and 1 mM MgSO₄) adjusted to pH 7.4. Electrophysiological recordings were made in buffers (0.1 M NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MES, 1 mM CaCl₂ and 1 mM MgCl₂) adjusted to different pHs using HCl or NaOH. Oocyte preparation and recordings were made as previously described(16). All recordings were done at a holding potential of -40 mV(16). For proton concentration response-curves, oocytes were perfused with varying pH solutions for 30s-3 min and rinsed in neutral pH solution for 1-3 min depending upon the time needed to reach maximal response of the mutants tested. Traces were analyzed with Clampfit - Axon (Molecular Devices), AxoGraph X (Axograph) or Plot.

Protein expression in Xenopus oocytes for immunolabeling

Defolliculated stage VI *Xenopus* oocytes were injected in the nucleus with a water-based mix of GLIC-HA (80ng/μl) and GFP (10ng/μl) cDNA in separate pmt3 vectors. Control oocytes were injected with GFP alone. Oocytes were incubated in modified Barth's medium at 18°C for 48-72h for protein expression. GFP positive cells were then fixed in 4% paraformaldehyde O/N 4°C, blocked with PBS + 4% horse serum for 30 min RT, and immunolabeled in PBS + 2% horse serum using a rabbit anti-HA primary antibody (1.5 hrs) and an anti-rabbit Cy5 coupled secondary antibody (1 hr, Invitrogen). Oocytes were re-fixed with 4% paraformaldehyde 16 hrs at 4°C, placed into 3% low-melting agarose blocks, and subsequently sliced at 40 μm intervals. Slices were analyzed using epi-fluorescence microscopy with constant exposure times for visualization of the labeled HA tag and GFP.

References:

1. Sauguet L, *et al.* (2013) Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *EMBO J* 32(5):728-741.
2. Kabsch W (2010) Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Cryst. D* 66:133-144.
3. Anonymous (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50(Pt 5):760-763.
4. McCoy AJ, *et al.* (2007) Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* 40(Pt 4):658-674.
5. Murshudov GN, Vagin AA, & Dodson EJ (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53(Pt 3):240-255.
6. Emsley P & Cowtan K (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
7. Smart OS, *et al.* (2012) Exploiting structure similarity in refinement: automated NCS and target-structure restraints in BUSTER. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 4):368-380.
8. Blanc E, *et al.* (2004) Refinement of severely incomplete structures with maximum likelihood in BUSTER-TNT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60(Pt 12 Pt 1):2210-2221.
9. Davis IW, *et al.* (2007) MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W375-383.
10. Nicholls RA, Long F, & Murshudov GN (2012) Low-resolution refinement tools in REFMAC5. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 68(Pt 4):404-417.
11. Lindahl E, Azuara C, Koehl P, & Delarue M (2006) NOMAD-Ref: visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode analysis. *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue):W52-56.
12. Tama F & Sanejouand YH (2001) Conformational change of proteins arising from normal mode calculations. *Protein Eng* 14(1):1-6.
13. Zheng W & Auerbach A (2011) Decrypting the sequence of structural events during the gating transition of pentameric ligand-gated ion channels based on an interpolated elastic network model. *PLoS Comput Biol* 7(1):e1001046.
14. Tekpinar M & Zheng W (2010) Predicting order of conformational changes during protein conformational transitions using an interpolated elastic network model. *Proteins* 78(11):2469-2481.
15. Smart OS, Neduelil JG, Wang X, Wallace BA, & Sansom MS (1996) HOLE: a program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph* 14(6):354-360, 376.
16. Nury H, *et al.* (2011) X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 469(7330):428-431.

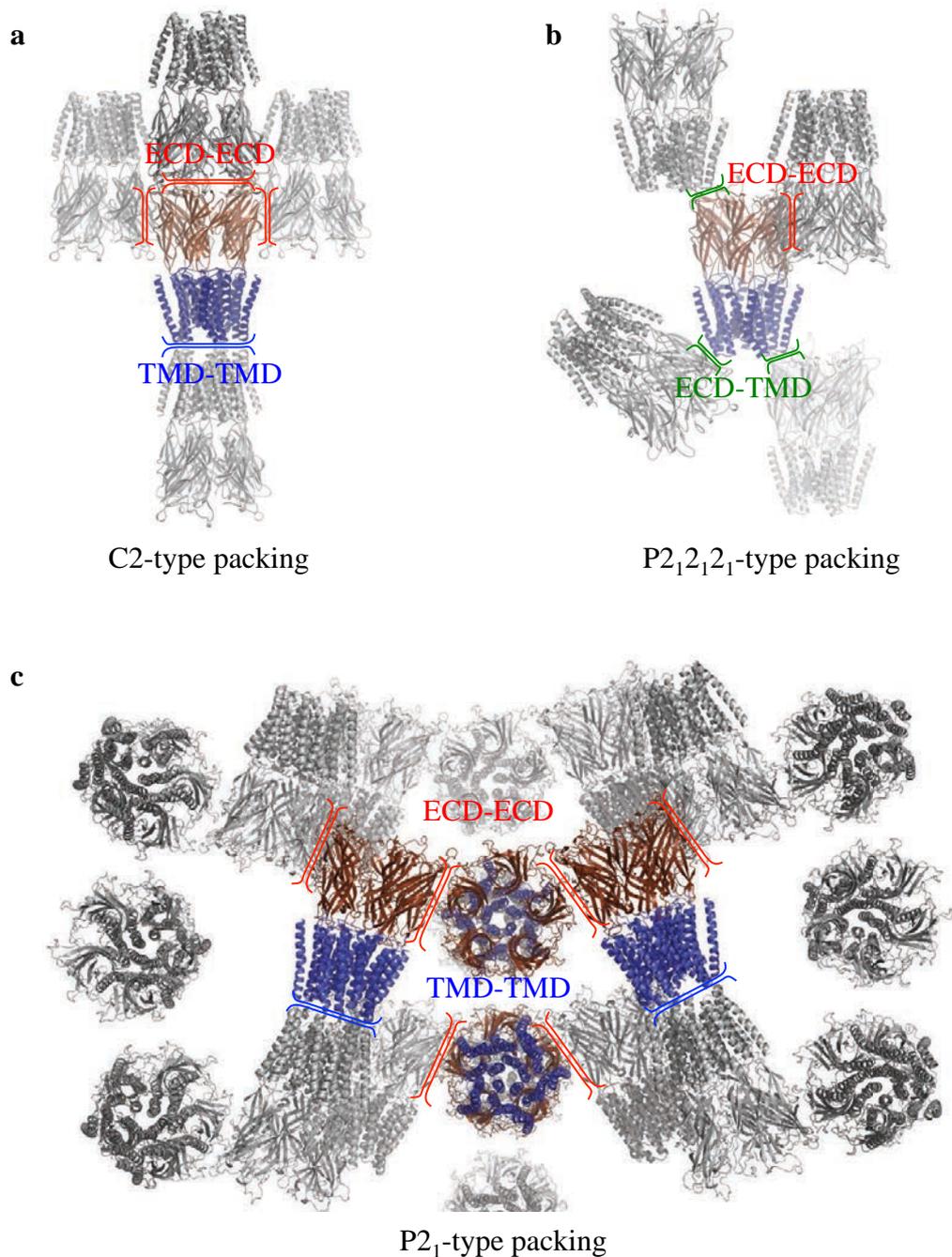


Figure S1: Packing of GLIC crystals. Cartoon representation of the GLIC structure in the context of its different crystal forms, respectively obtained at pH 4 (**a,b**) and pH 7 (**c**). Pentamers composing the centered asymmetric unit are coloured in brown and blue to depict the ECD and TMD, respectively. Pentamers from neighbouring asymmetric units are shown in grey. The crystal contacts between neighbouring pentamers are underlined in red.

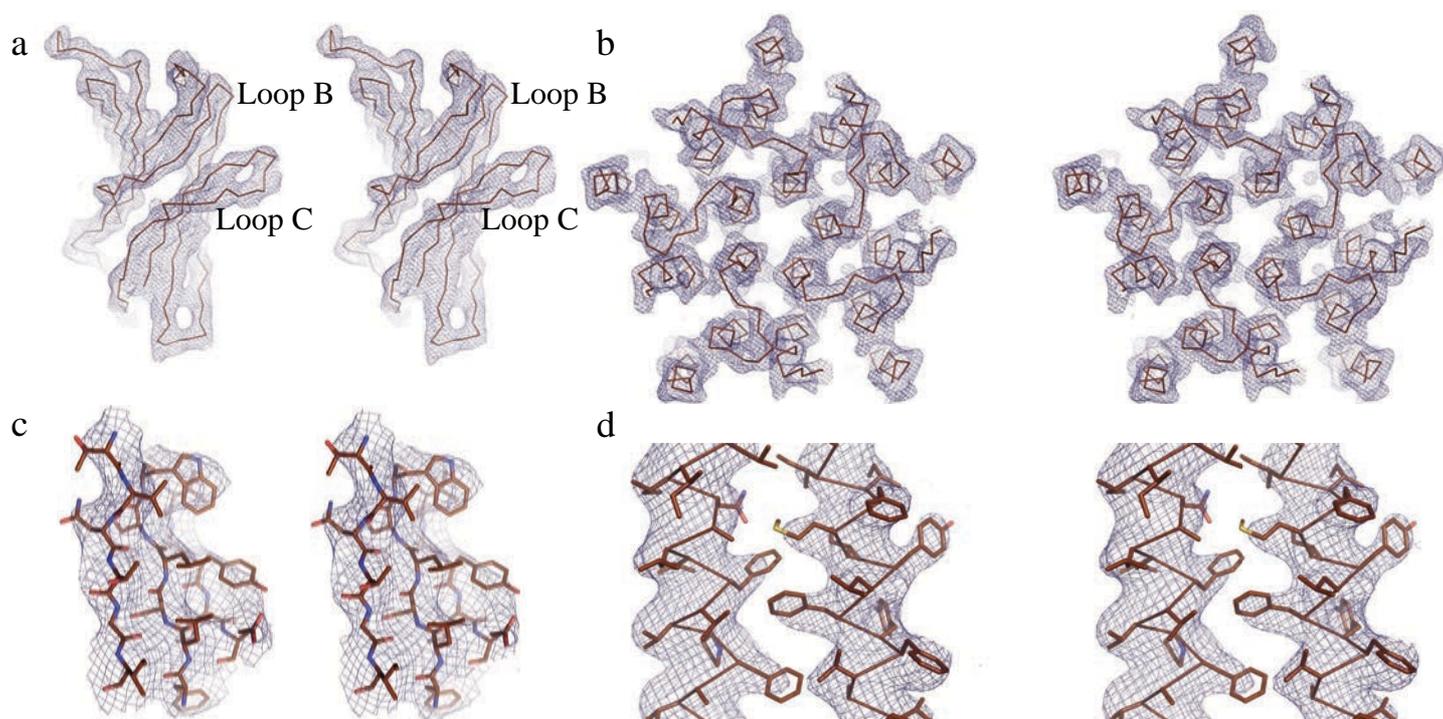


Figure S2: Stereo views of the electron density in representative regions. Close-views of two functionally important regions of the protein: a monomer of the ECD (**a**) and of the TMD (**b**). Side chains were included in the model in the most ordered regions of the ECD (**c**) and in the TMD (**d**). The blue mesh is the maximum likelihood 2mFo-DFc electron density map contoured at a level of 1σ . Main chain and side chains atoms are represented as ribbon and sticks, respectively.

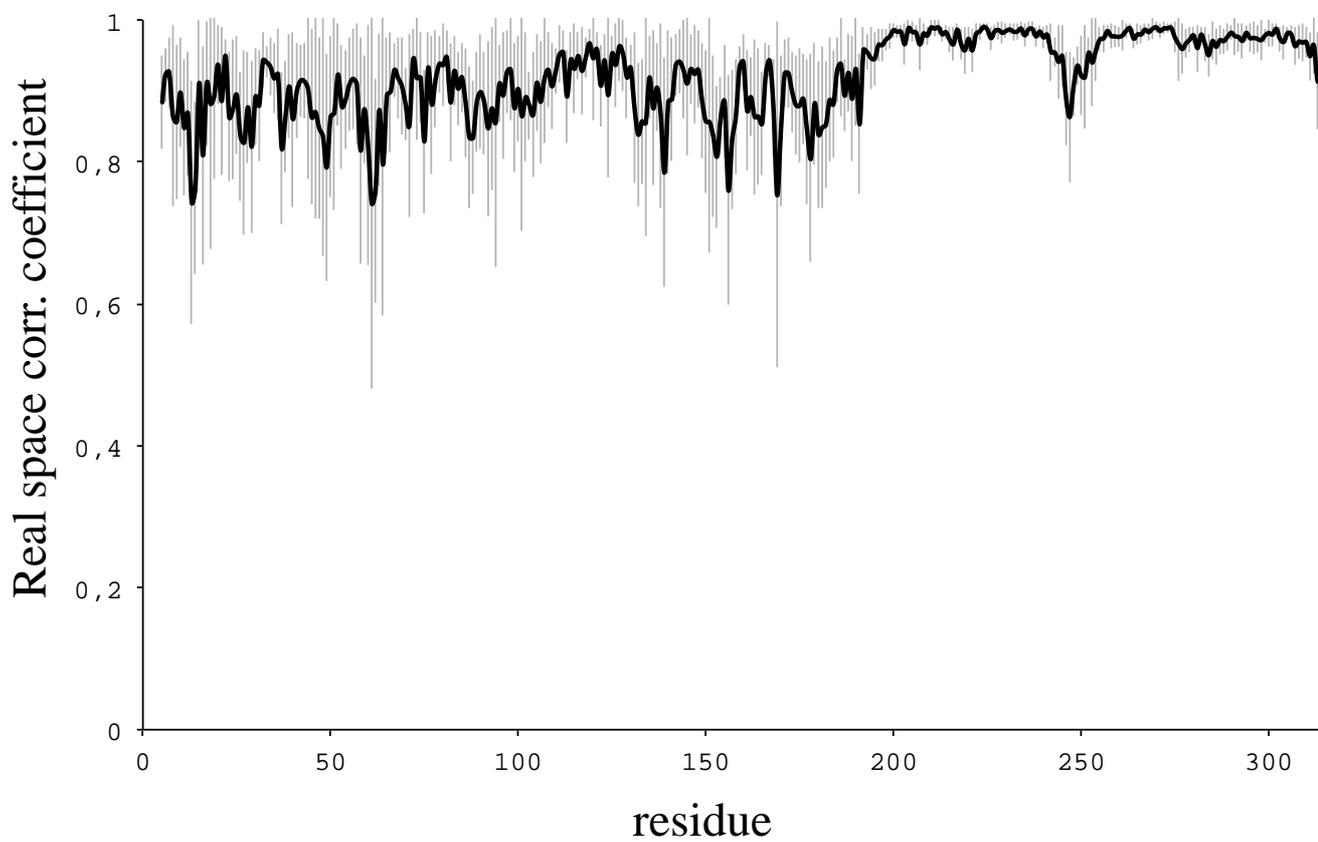


Figure S3: Real space correlation coefficient as a function of residue number for the main chain atoms. The mean value, calculated over the 20 monomers, is in thick black line and the standard deviation is in grey.

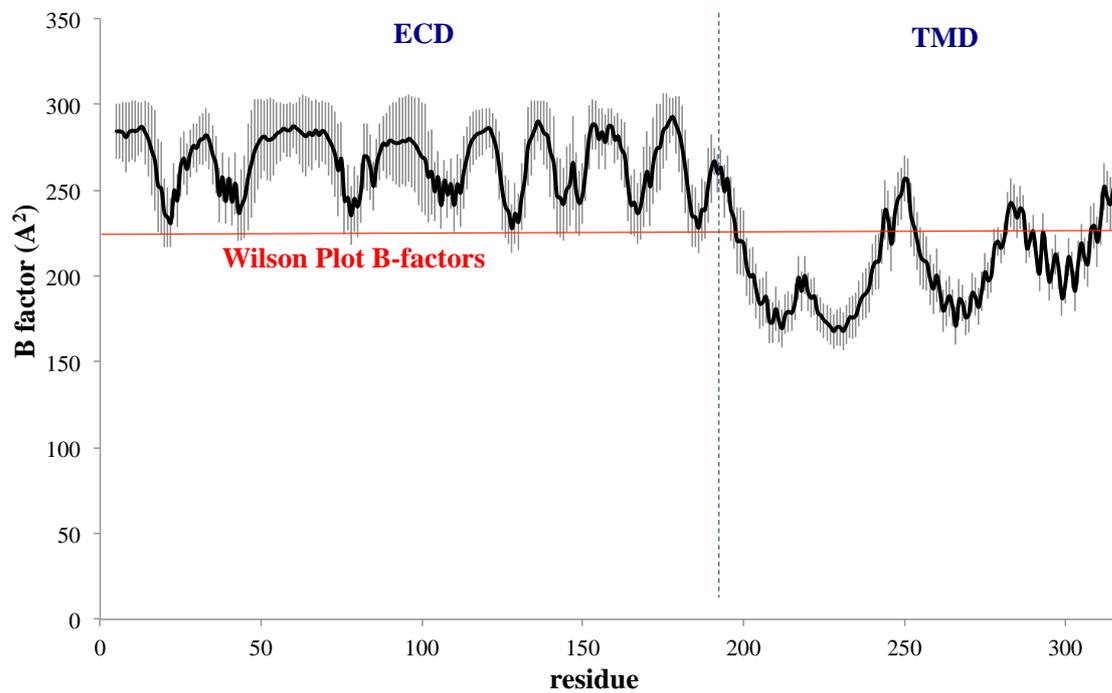


Figure S4: Plot of B-factor by residue. B-factors averaged over the 20 chains are plotted by residue (black line). The errors bars indicate the root mean square deviation. The estimated Wilson plot B-factors are indicated by a red line. B-factors are higher in the ECD than in the TMD, in line with the greater flexibility that is observed in the ECD.

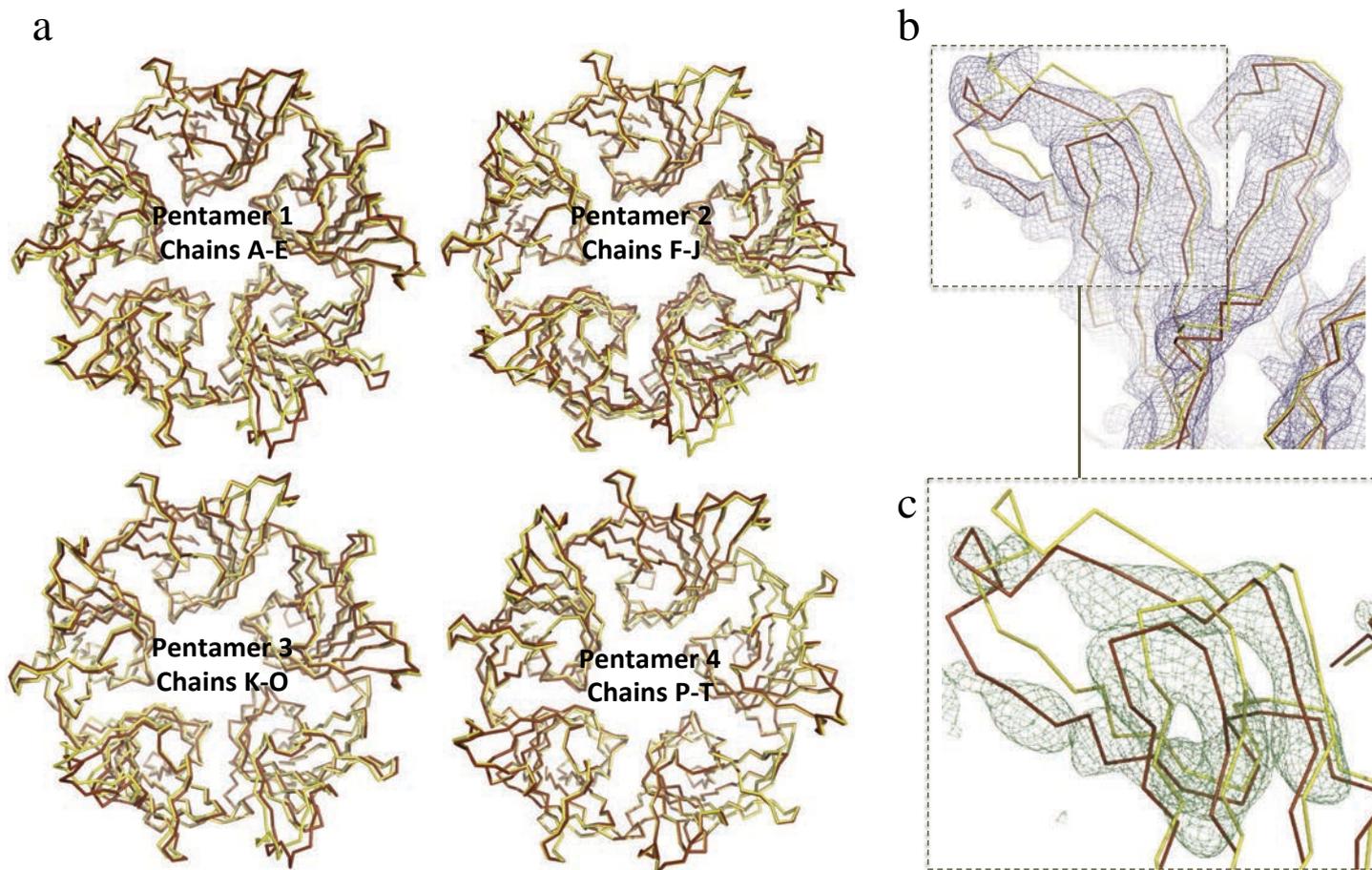


Figure S5: Models of GLIC pH 7 structure obtained after imposing or not imposing strict non-crystallographic symmetry (NCS). **a**, Ribbon representation of the ECD of the four pentamers that compose the asymmetric unit. The models obtained after using the auto_NCS refinement option (brown) or strict NCS (yellow) are superimposed. **b**, Close view showing that imposing strict NCS during refinement results in at least one ECD monomer per pentamer being moved out from the electron density. The blue mesh is the maximum likelihood 2mFo-DFc electron density map contoured at a level of 1σ . **c**, illustration of an additional control performed in order to avoid model bias when calculating the 2mFo-DFc map. The green mesh is the Fourier difference mFo-DFc map that was calculated when selected regions of the model were omitted in all 20 monomers.

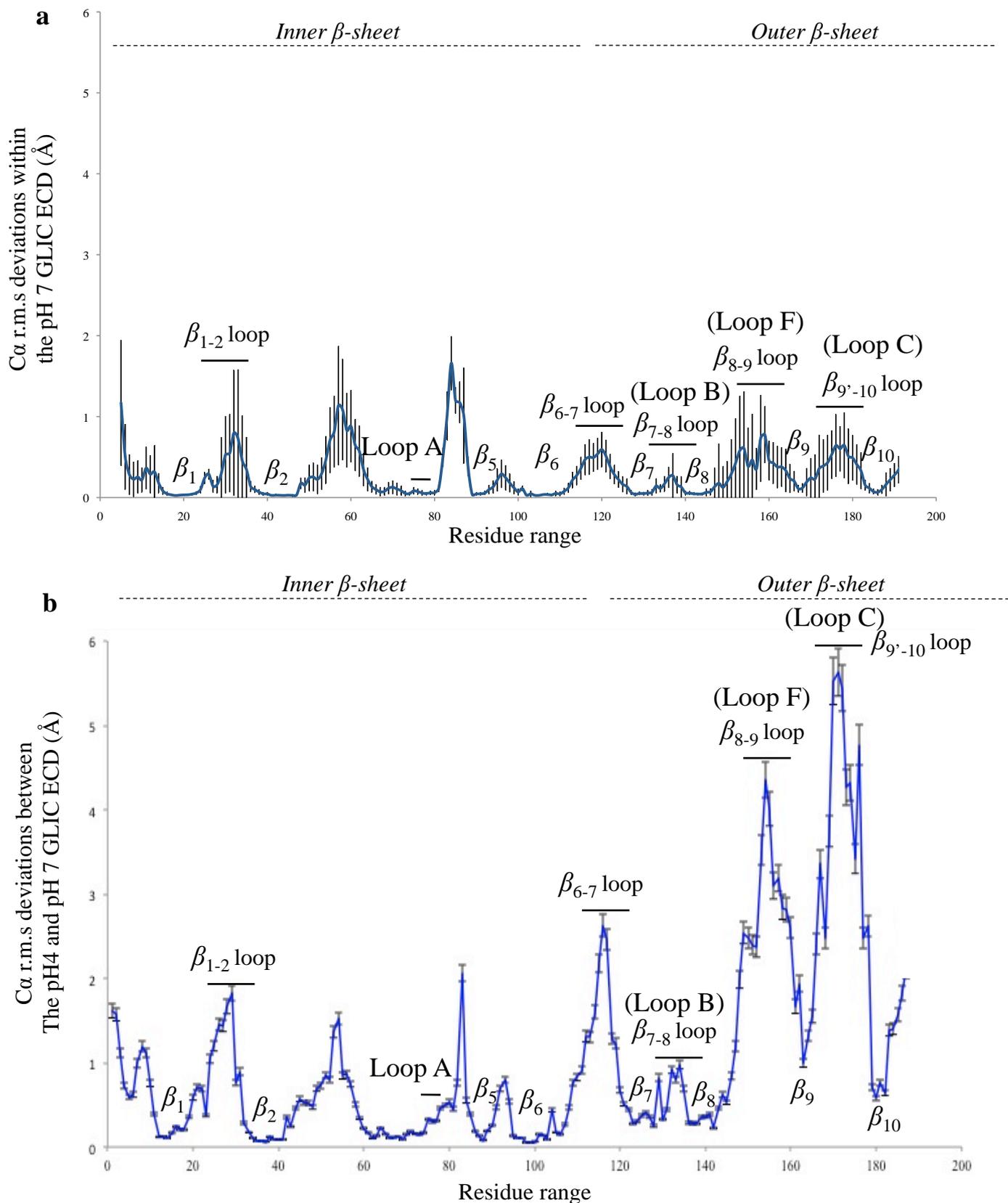
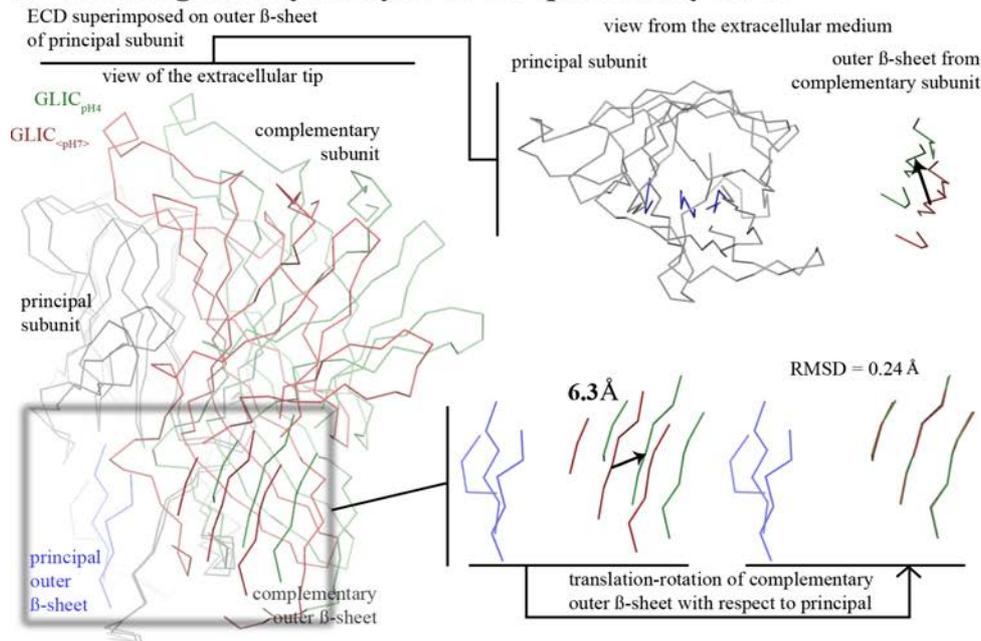


Figure S6: $C\alpha$ root mean square deviations between the pH 7 GLIC ECDs and with the pH 4 GLIC ECD. a) $C\alpha$ root mean square deviations within the 20 copies of the pH 7 GLIC ECDs. b) $C\alpha$ root mean square deviations between the 20 copies of the pH 7 GLIC ECDs and the pH 4 GLIC ECD.

a - Semi-rigid-body analysis at the quaternary level



b - Semi-rigid-body analysis at the tertiary level

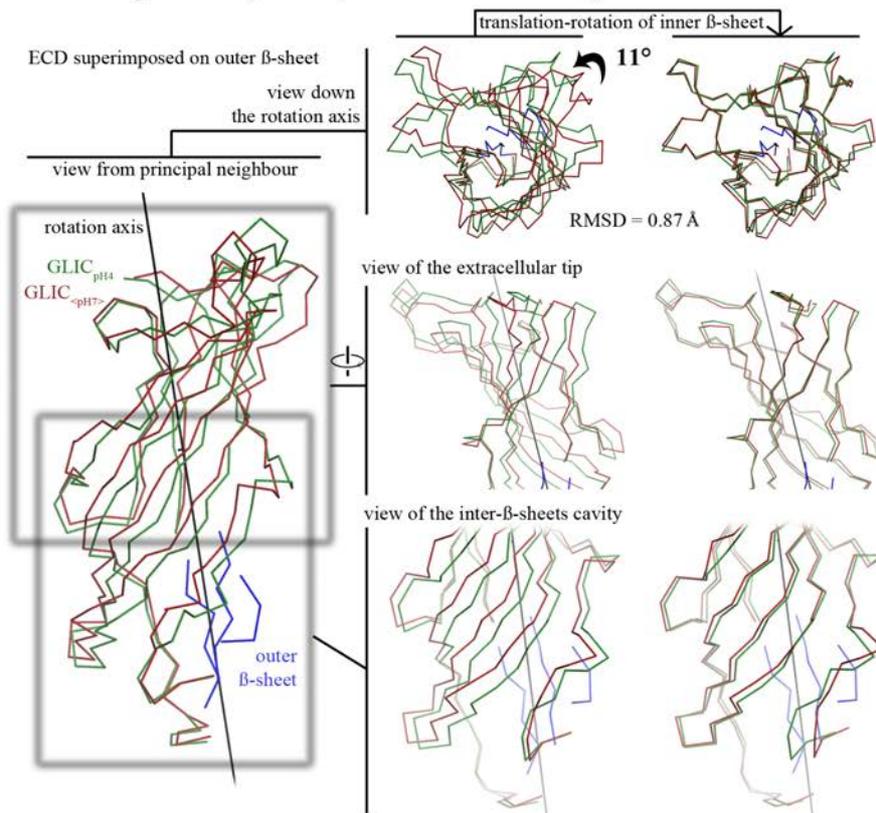


Figure S7: Semi-rigid body analysis of the structural rearrangements between the pH4 (green) and the average pH7 (red) forms of GLIC. Superimpositions were made using the outer beta sheet of the principal subunit (blue). **a.** Quaternary level. (left) Contextual view of the ECD dimer after superimposition. (right, top) View from the extracellular medium of the full principal subunit and the outer β -sheet from the complementary subunit. (right, bottom) View of the outer β -sheets alone. The translational movement of the outer β -sheet is illustrated with an arrow. The resulting superimposition is shown, together with the corresponding RMSD. **b.** Tertiary level. (left) View of the complementary face of one ECD subunit. The rotation axis is shown (black line). (right) Three views, before (left) and after (right) rotation, of the inner β -sheet.

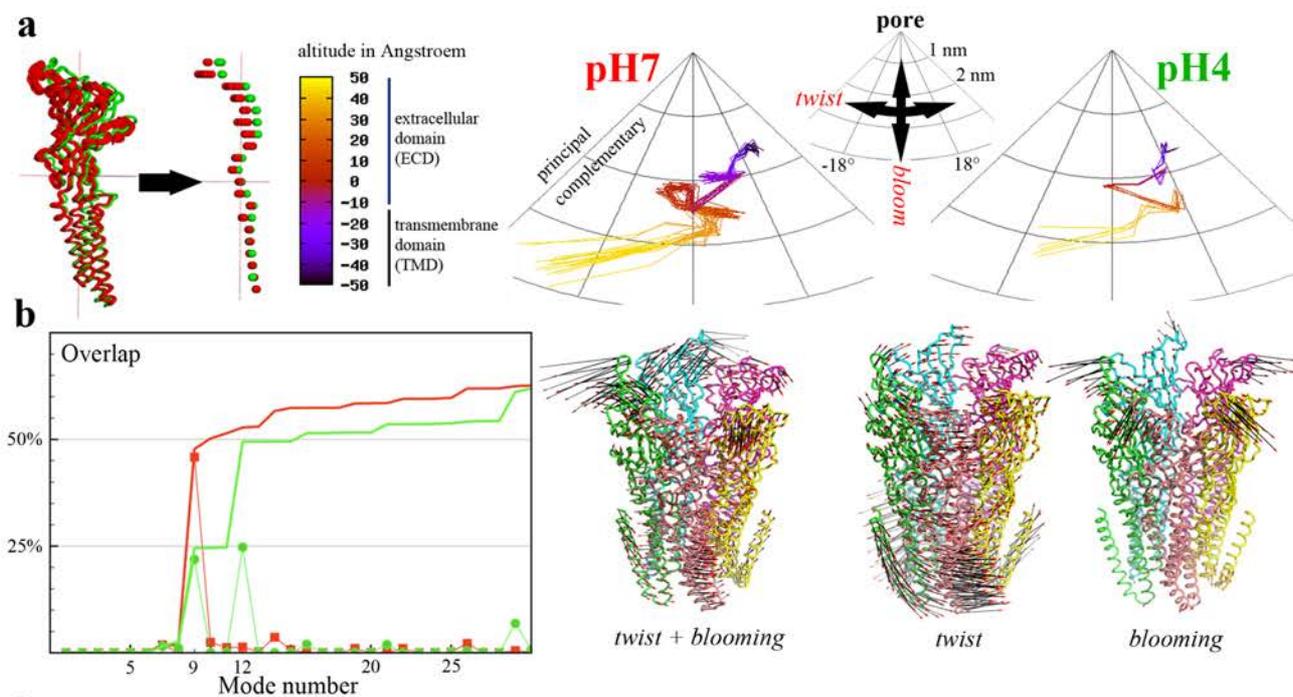


Figure S8: Analysis of the twist and bloom movement in the ECD. **a**, Mass distribution in cylindrical coordinates. Comparing the resulting profiles between the two sets of structures highlight the combination of radial and tangential movements that relate them. As indicated in the upper right part of the panel, these types of motions can be understood as corresponding to two different normal modes (see **b**): twist and blooming, respectively. **b**, Normal Mode Analysis. Overlap between the difference vectors relating the two structures at pH 4 and pH 7 and the first 30 normal modes. The 9th normal mode of the pH 7 structure has an overlap (in red) of 47% and corresponds to a combination of twist and (asymmetric) blooming. Conversely, modes 9 (twist) and 12 (blooming) of the pH 4 structure have an overlap respectively of 22 and 25% with the difference vectors (pH 7 – pH 4).

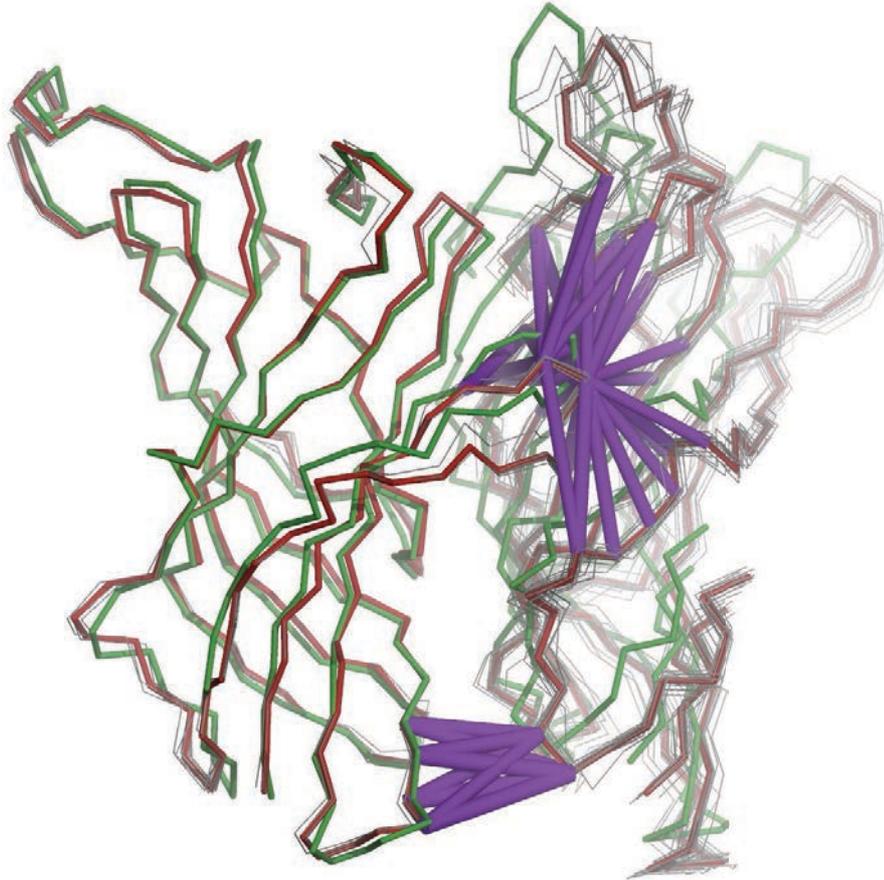


Figure S9: Analysis of the ECD-ECD interface. Localisation of strong pair-wise cross-correlations between the $C\alpha$ atoms of one subunit and its immediate neighbour in the GLIC pH 7 structures, calculated as described in Methods. Here the atoms used for the superposition are the $C\alpha$ atoms of the *principal* subunit. The pH 4 dimer is coloured in green, while the pH 7 dimers are coloured in grey except for one representative copy. The largest correlations (i.e. larger than 0.5) between adjacent subunits are indicated by purple cylinders whose radii are proportional to the strength of the correlation.

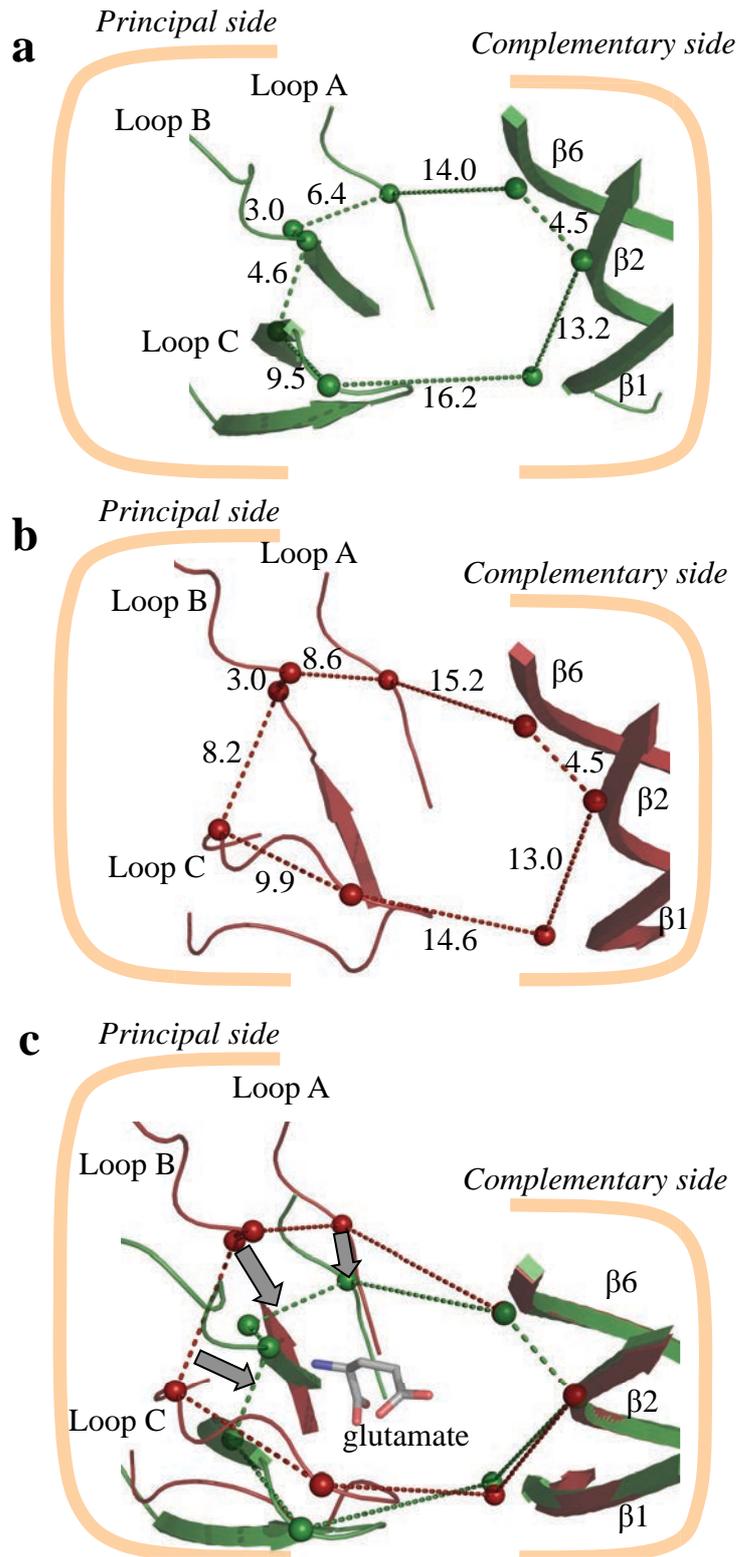
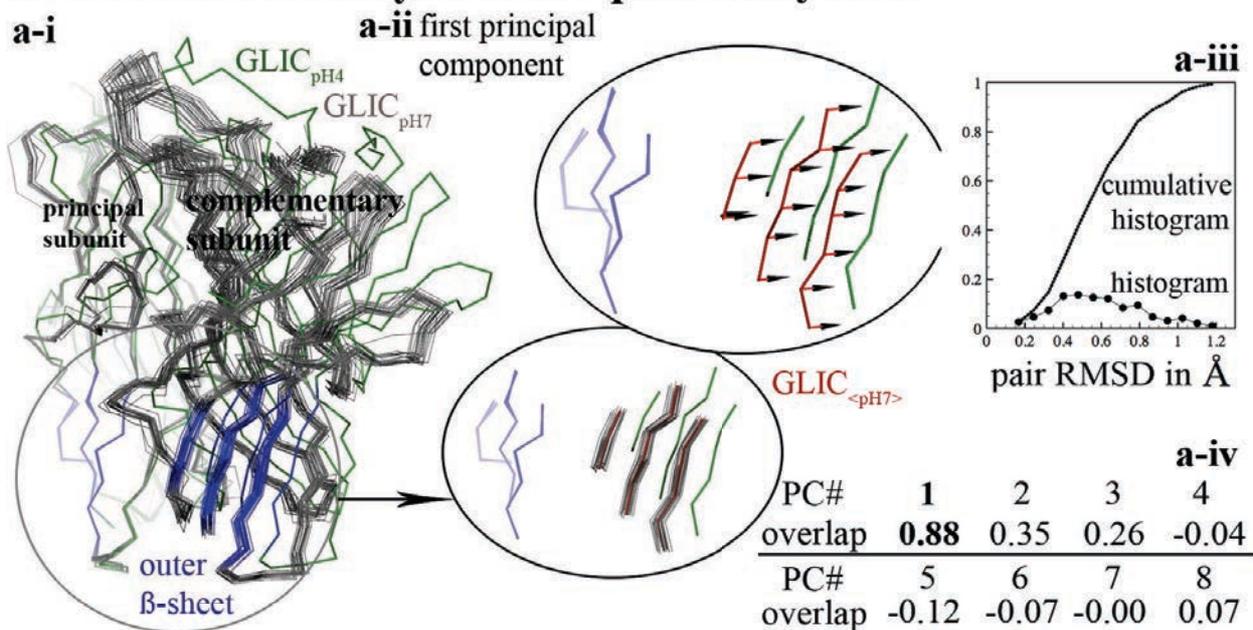


Figure S10: Enlarged view of the orthosteric site in GLIC. Structural elements forming the binding pocket are represented in the cartoon mode for GLIC pH 4 (**a**) and GLIC pH 7 (**b**). Superimposing both pockets (**c**) based on their complementary side illustrates the contraction of the orthosteric site upon proton binding and activation. This observation may be extrapolated to other pLGICs that are activated by more complex ligands. As an example, glutamate (grey) is shown as transparent sticks, based on GluCl superposition on GLIC pH 7 structure. Glutamate is located in a strategic position to favour interfacial contacts between the both sides of the pocket. The dashed lines show the distances between the C α atoms of the binding-site residues and are used to map the shape of the site.

a - Fluctuation analysis at the quaternary level



b - Fluctuation analysis at the tertiary level

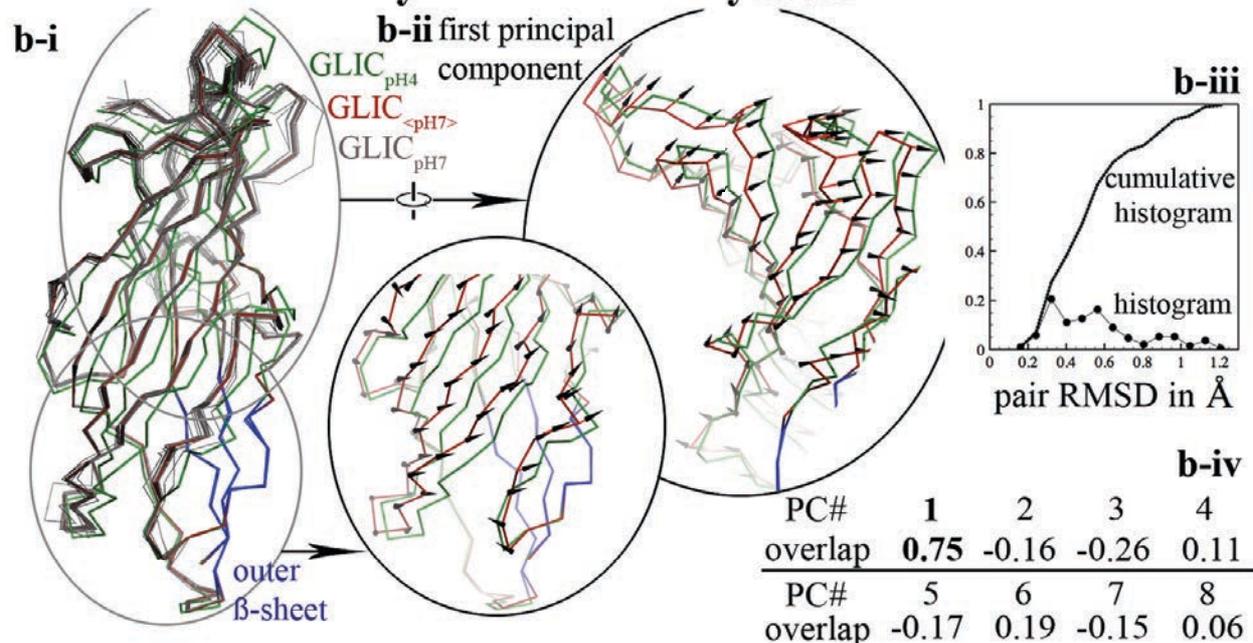


Figure S11: Fluctuation analysis of the pH7 form of GLIC. The average pH7 form (resp. the 20 pH7 copies, and the pH4 copy) is shown as red (resp. grey and green) ribbons. All superimpositions were made using the outer β -sheet of the principal subunit (blue). **a.** Quaternary level. i. Contextual view of the ECD dimer after superimposition. ii. (bottom inset) Same view of the outer β -sheets alone. (top inset) Same view. The first principal component of the fluctuations is shown with arrows. iii. Histogram of the RMSD between 190 pairs of outer β -sheets of the complementary subunit (16 C α atoms). iv. Table of the overlap of each principal component with the difference vector joining the pH7 to the pH4 form. **b.** Tertiary level. i. View of the complementary face of one ECD subunit. ii. The first principal component is shown with arrows from two different views. iii. Histogram of the RMSD between 190 pairs of inner β -sheets of the principal subunit (176 C α atoms). iv. Table of the overlap of each principal component with the difference vector joining the pH7 to the pH4 form.

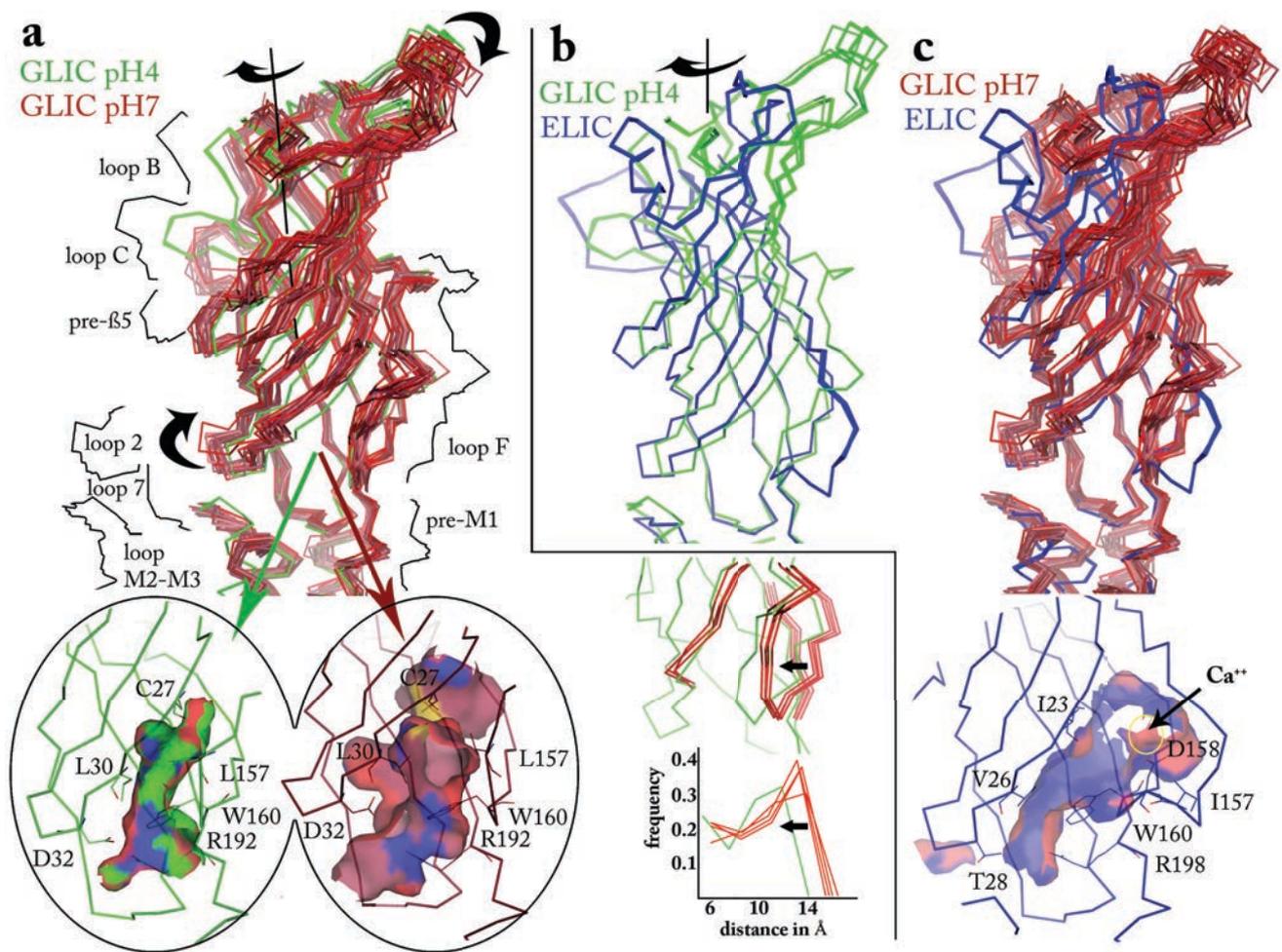


Figure S12: Superimposition of GLIC pH4 and pH7 forms (a), GLIC pH4 and ELIC (b) and GLIC pH7 and ELIC (c) showing the creation of a pocket (represented as surfaces at the bottom of the panel) in the most cytoplasmic region of the hydrophobic core of the ECD. Residues delineating the pocket are indicated on the figure, and represented as thin lines. The widening of this pocket at pH 7 is illustrated by a histogram of distances between residues bordering the pocket.

	<u>β1-2 loop</u>	<u>β8-9 loop</u>	<u>pre-M1 loop</u>	<u>M2-3 loop</u>
	32	157	192 194 195	246 252
GLIC	DDKAE	FLTGWD	SRQ--YF	LPKTPY-MTYT
GABA1RN	SDHDM	RLNQYL	KRKPLFY	LPKVAY-ATAM
GABA2RN	SDTDM	RLNQYL	KRKIGYF	LPKVAY-ATAM
GABB1RN	SEVNM	ELPQFS	KRNIGYF	LPKIPY-VKAI
GABB2RN	SEVNM	ELPQFS	KRNIGYF	LPKIPY-VKAI
GLYA1ARN	AETTM	TLPQFI	ERQMGYY	LPKVSY-VKAI
GLYA3RN	AETTM	TLPQFL	ERQMGYY	LPKVSY-VKAI
5-HT3MM	DEKNQ	NQGEWE	RRRVVNV	LPATIG-TPLI
NICA2RN	DEKNQ	ESGEWA	RRLPLFY	IPSTSLVIPLI
NICA7GG	DEKNQ	SNGEWL	RRRTLYY	MPATSDSVPLI
NICA1TC	DEVNQ	ESGEWV	QRIPLYF	IPSTSSAVPLI
GluCl α	DVVNM	SLPSFQ	KRE--FS	LPPVSY-IKAI
ELIC	NTLEQ	EID \underline{E} WW	VRN--PS	LPKTPY-TTVI

Figure S13: Partial multiple-sequence alignment of GLIC amino acid sequence with other pLGICs. The alignment is generated with representative human pLGICs, the α subunit of glutamate chloride channel from *C. elegans* (GluCl) and the bacterial ELIC receptor from *E. chrysanthemi*. The mutated positions are highlighted in yellow. Numbering refers to GLIC sequence. Residues conserved throughout the pLGIC family are underlined.

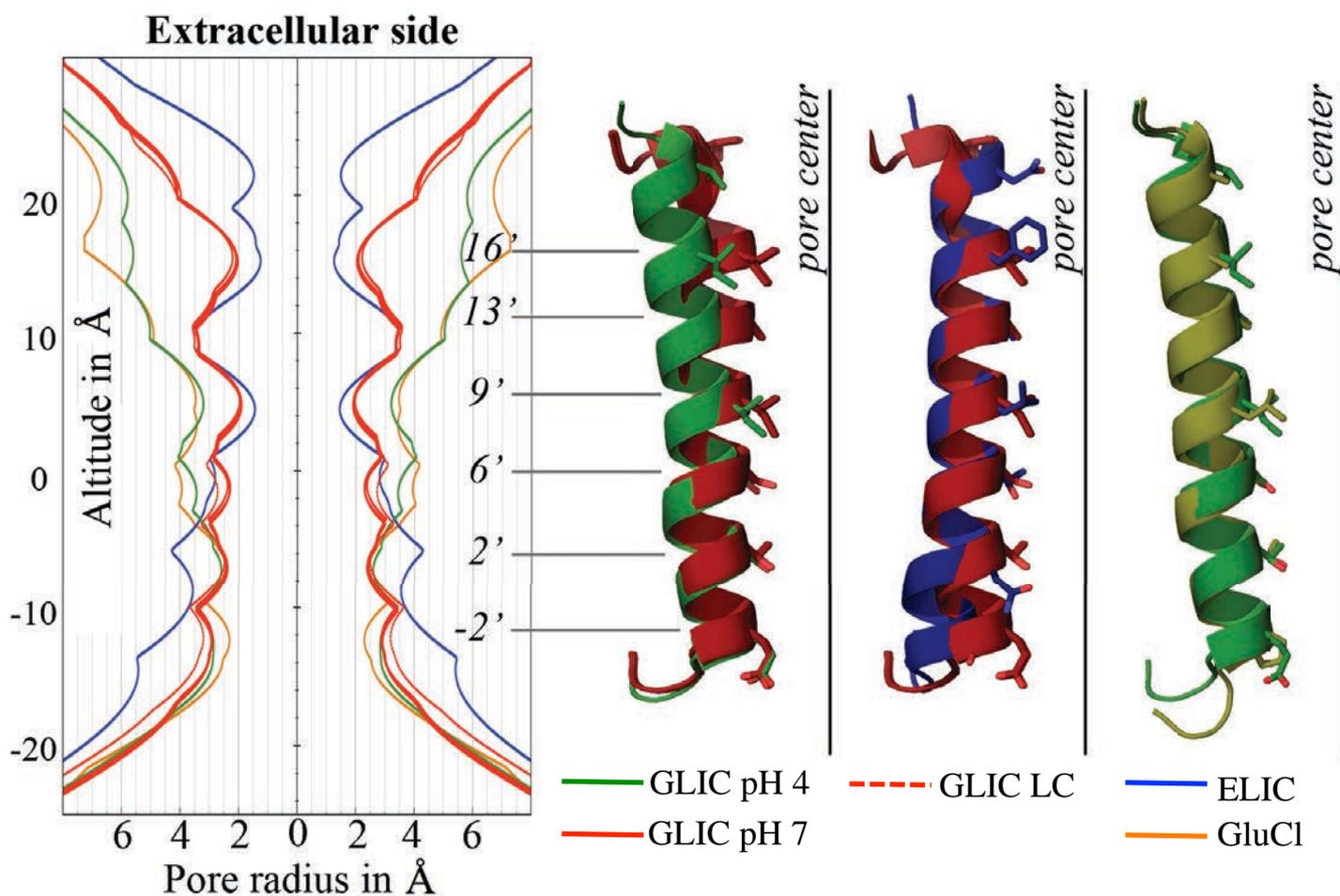


Figure S14: Pore radii analysis. (Left) Pore radius along the channel axis in the open (PDB ID 4HFI), LC (GLIC H11'F; PDB ID 3TLT) and the four copies of pentamers of the GLIC pH 7 structure, as well as in ELIC (PDB ID 2VL0) and GluCl (PDB ID 3RHW). (Right) Superimposition of the pore-lining helix M2 in the three known forms of GLIC (pH 4, pH 7 & LC) as well as GluCl and ELIC.

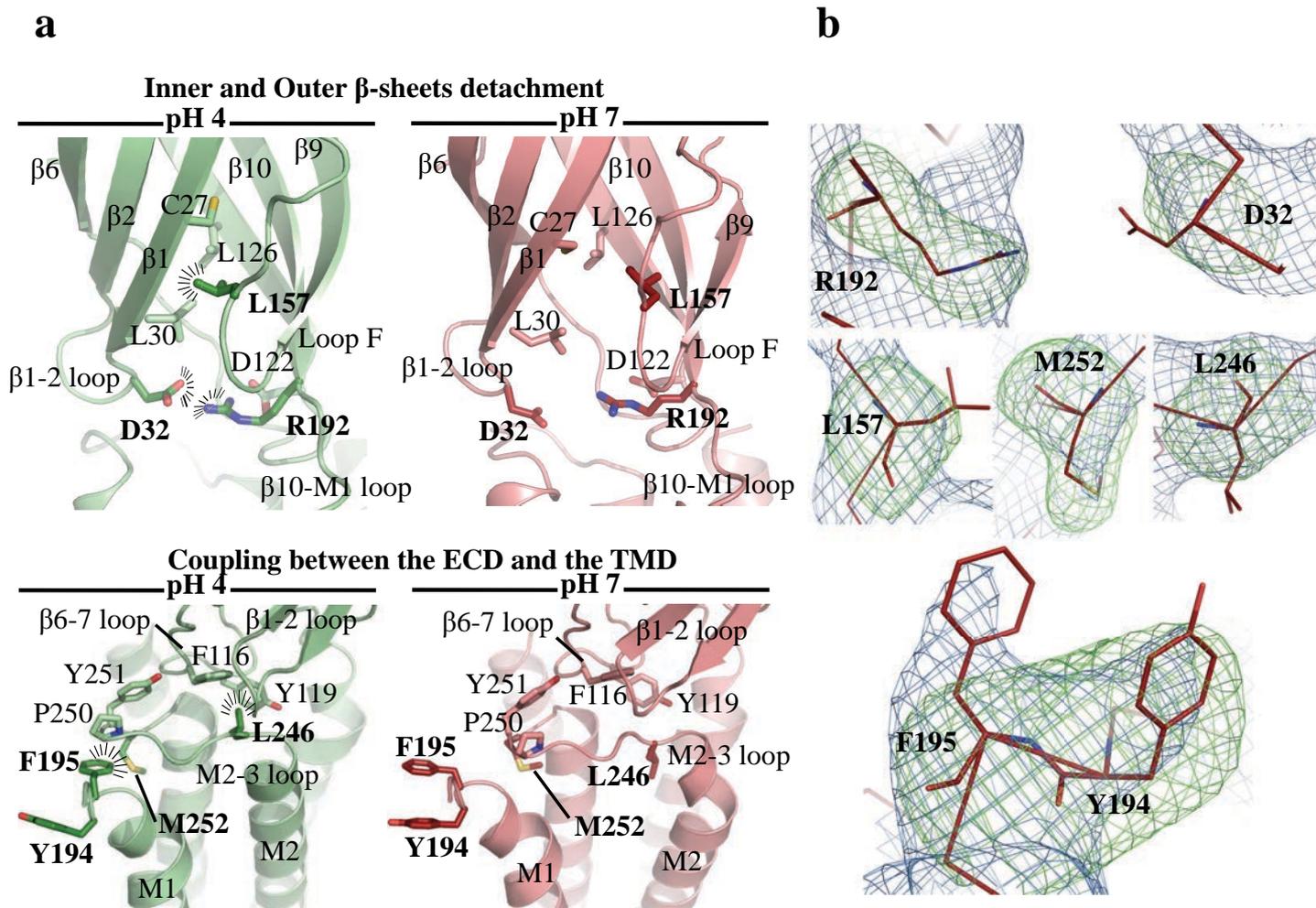


Figure S15: Differential interaction networks at the ECD-TMD interface in the GLIC pH 4 and pH 7 structures. **a**, Cartoon representation of the GLIC pH 4 structure (in green) and the GLIC pH 7 structure (in red), illustrating the redistribution of contacts that occurs at the level of the β -sheets (top panels) and at the level of the ECD-TMD interface (bottom panels). Sticks represent the side chains of key residues. The positions corresponding to residues with a more pronounced colour were mutated and tested by electrophysiology (see **Table 1**). **b**, Close views of the electron density surrounding the residues that were mutated and tested by electrophysiology. The blue mesh is the maximum likelihood 2mFo-DFc electron density map contoured at a level of 1σ . The green mesh is the mFo-DFc electron density map contoured at a level of 3σ calculated when the mutated residues were omitted from the model.

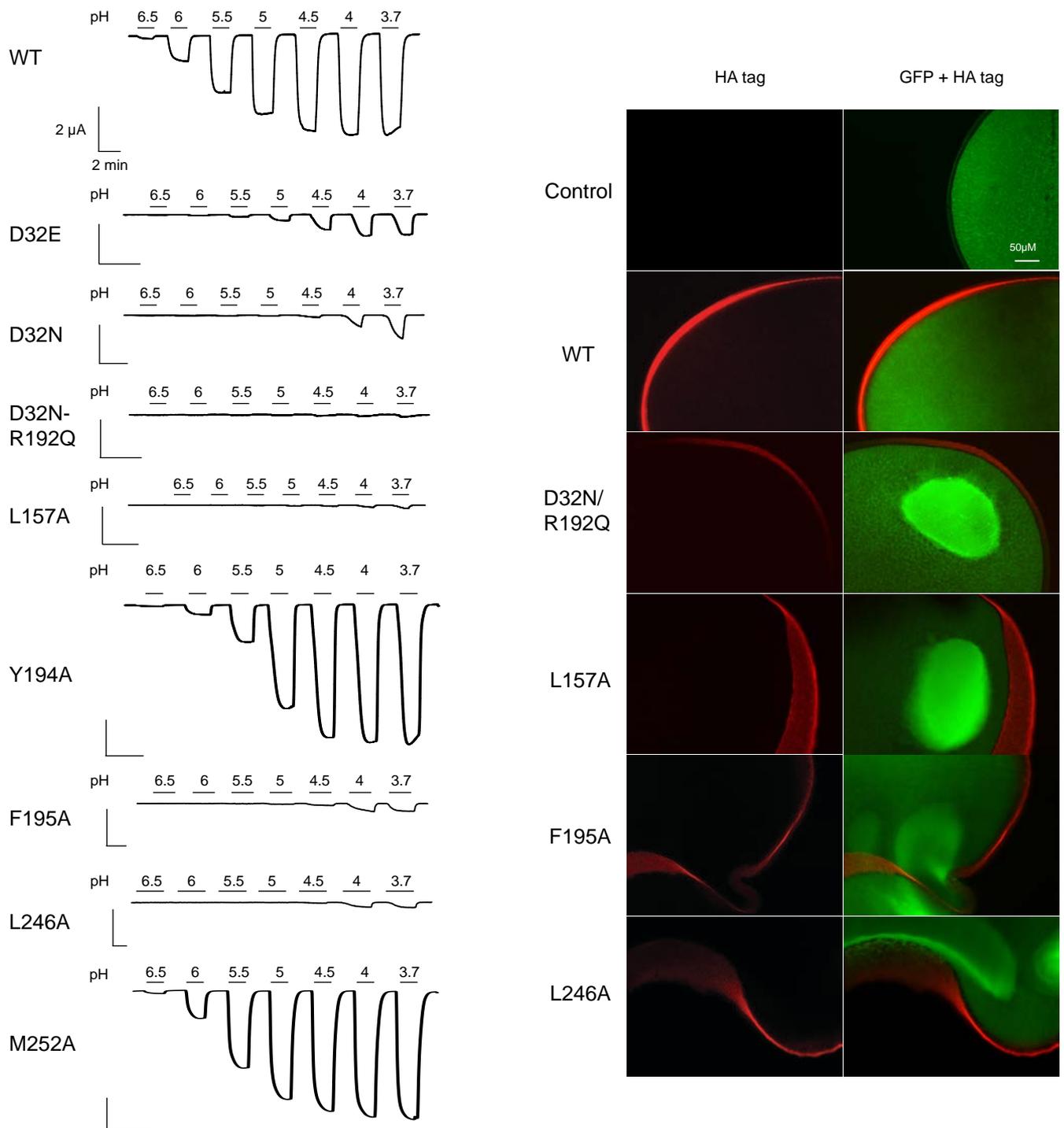


Figure S16: Function and expression of GLIC mutants. Left panel: Representative proton-response traces with respective scale bars for GLIC WT and mutants. Right panel: Immunolabeling of oocytes co-injected with GLIC-HA WT or loss of function mutants and GFP. Control oocytes are injected with GFP only. Immunolabeling was directed against the HA tag. Labeling membrane-surface expressing receptors is shown in red whereas GFP, expressed in the cytoplasm is shown in green.

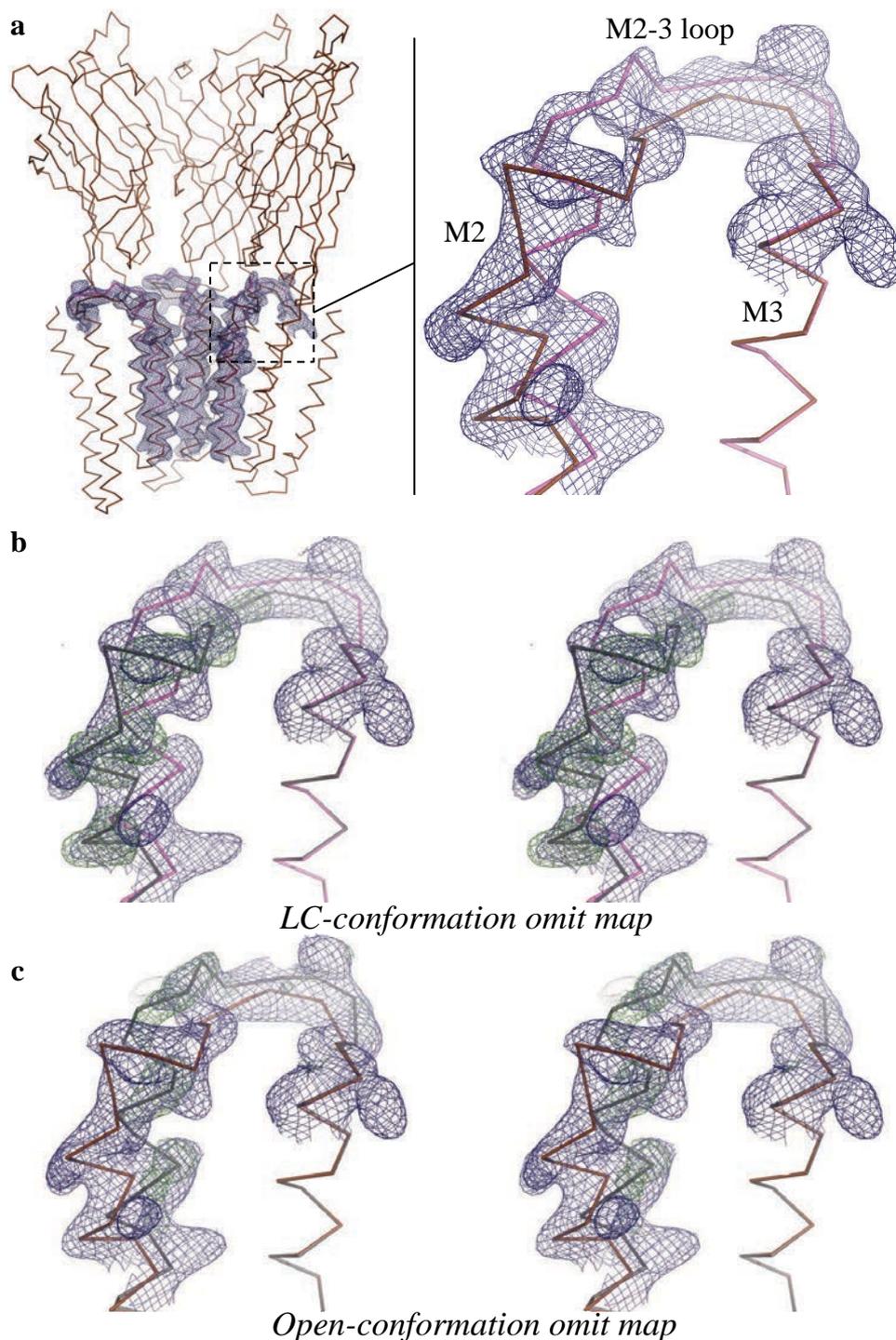


Figure S17: Open and LC forms of GLIC co-exist at pH 4. **a**, Left panel. Ribbon representation of the GLIC receptor displaying two alternative conformations of the M2 helix and the M2-3 loop, the open (magenta) and LC (brown) conformations. The receptor is viewed from the side and the two front subunits are removed for clarity. The blue mesh is the maximum likelihood 2mFo-DFc electron density map surrounding the M2 helix and the M2-3 loop contoured at a level of 1σ . Right panel is a close-up view of a region encompassing the tip of M2 and the M2-3 loop. **b-c**, Same close-views as in **a**, but displaying the 2mFo-DFc (contoured at 1σ) and mFo-DFc (contoured at 3σ) electron density maps (blue and green mesh, respectively) calculated when either the LC (**b**) or the open (**c**) conformations are omitted from the model (Regions omitted during refinement are shown in grey).

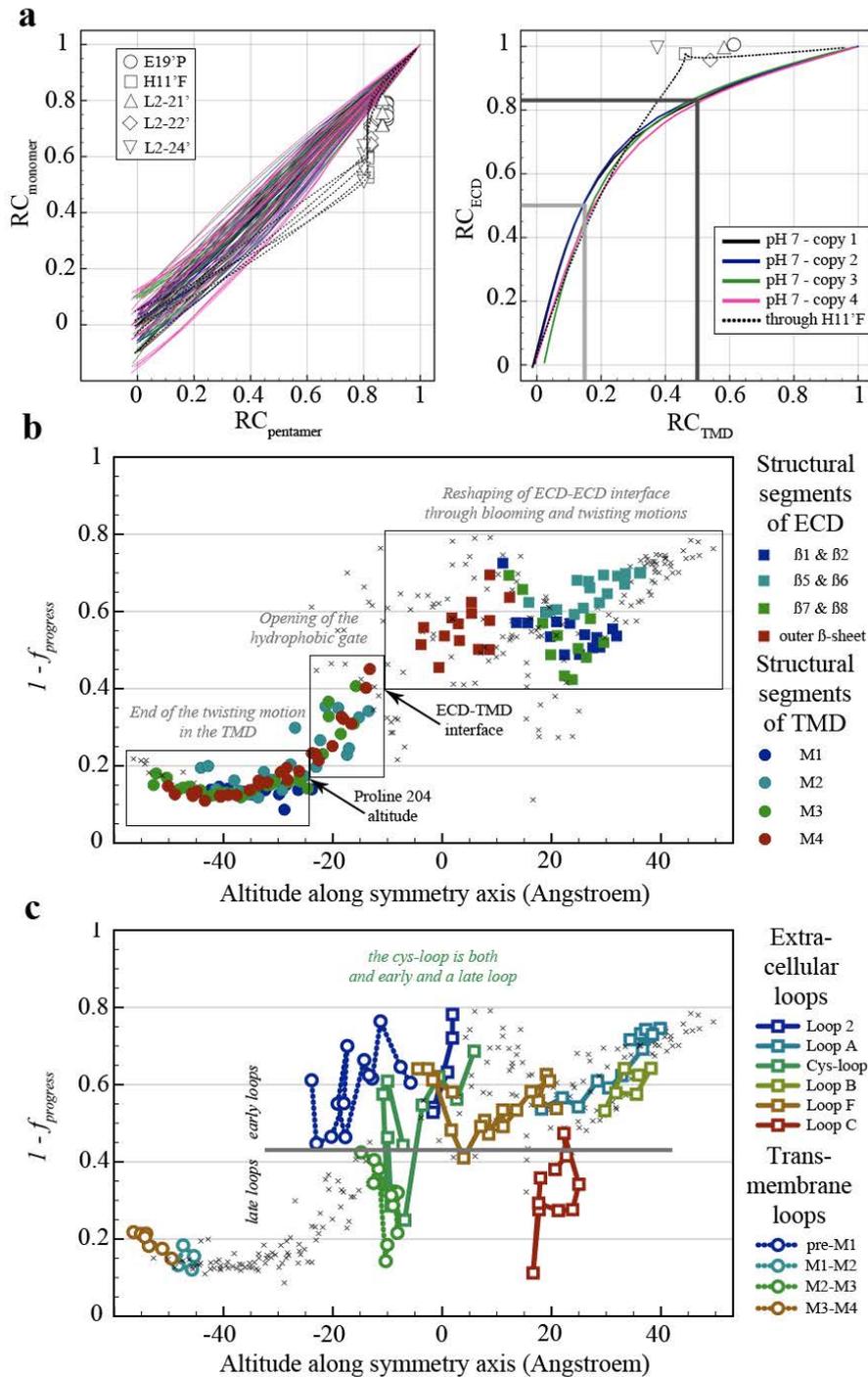


Figure S18: Coarse-grained trajectories of GLIC with iENM. The web-server iENM (<http://enm.lobos.nih.gov>) was used to generate plausible trajectories between the four copies obtained at neutral pH $GLIC_{\text{pH7}}$ (this work), the open $GLIC_{\text{open}}$ (PDB ID: 4HFI) and the locally-closed (LC) $GLIC_{\text{LC}}$ structures (H11'F mutant, PDB ID: 3TLT), at the C α level of description.

a - iENM-generated trajectories are mapped onto different reaction coordinates (RC). Plain lines correspond to trajectories between each copy of $GLIC_{\text{pH7}}$ and $GLIC_{\text{open}}$ (see color-code in the right inset). Dotted lines correspond either to the trajectory between the first $GLIC_{\text{pH7}}$ copy and the H11'F mutant $GLIC_{\text{LC}}$, or to the trajectory between $GLIC_{\text{LC}}$ and $GLIC_{\text{open}}$. All LC structures are indicated with symbols (see left inset). Coordinate (0,0) corresponds to $GLIC_{\text{pH7}}$ averaged over the four copies, and coordinate (1,1) corresponds to $GLIC_{\text{open}}$. (**left**) The trajectories are mapped onto monomeric and pentameric reaction coordinates (RC_{monomer} and RC_{pentamer}), to quantify the progress of conformational change at the tertiary *versus* quaternary level. (**right**) The trajectories are mapped onto extracellular domain (ECD) and transmembrane domain (TMD) reaction coordinates (RC_{ECD} and RC_{TMD}) to quantify the differential progress of conformational change in these two domains.

b,c - Each residue is assigned a f_{progress} parameter quantifying early/late movements (low/high value for f_{progress}). In **b** - (*resp.* **c** -) residues belonging to structural segments (*resp.* loops) are displayed with plain-color symbols (see color-code on the right). All other residues are displayed with small crosses.

	GLIC _{His10} pH 4	GLIC pH 7
Data collection		
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
Cell dimensions		
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	113.5, 127.6, 185.8	131.5, 384.1, 148.4
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 98.5, 90
Resolution (Å)	48.4-3.35 (3.53-3.35)	48.9-4.35 (4.59-4.35)
<i>R</i> _{pim}	0.049 (0.501)	0.048 (0.89)
<i>R</i> _{merge}	0.101 (1.04)	0.084 (1.58)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>)	12.9 (1.9)	10.8 (1.0)
Resol. at which <i>I</i> / σ (<i>I</i>)=2.0	3.37	4.60
CC _{1/2} / CC* of the last shell	0.69 / 0.90	0.28 / 0.66
<i>R</i> _{pim} in the last shell	0.474	0.472
Completeness (%)	99.8 (99.9)	99.6 (99.8)
Redundancy	5.2 (5.1)	4.1 (4.1)
Refinement		
Resolution (Å)	25.1-3.35	20.0-4.35
No. reflections	39210	94312
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	22.8/24.9	24.0/24.4
No. atoms		
Protein	13460	45859
Ligand/ion	50	-
<i>B</i> -factors		
Protein	116.7	239.1
Ligand/ion	168.9	-
Molprobit Analysis		
Ramachandran favored (%)	96.9	94.8
Ramachandran outliers (%)	0.06	0.1
Molprobit score [#]	100 th	100 th
R.m.s. deviations		
Bond lengths (Å)	0.009	0.008
Bond angles (°)	1.02	1.02

*Values in parentheses are for highest-resolution shell.

[#]100th percentile is the best among structures of comparable resolution; 0th is the worst

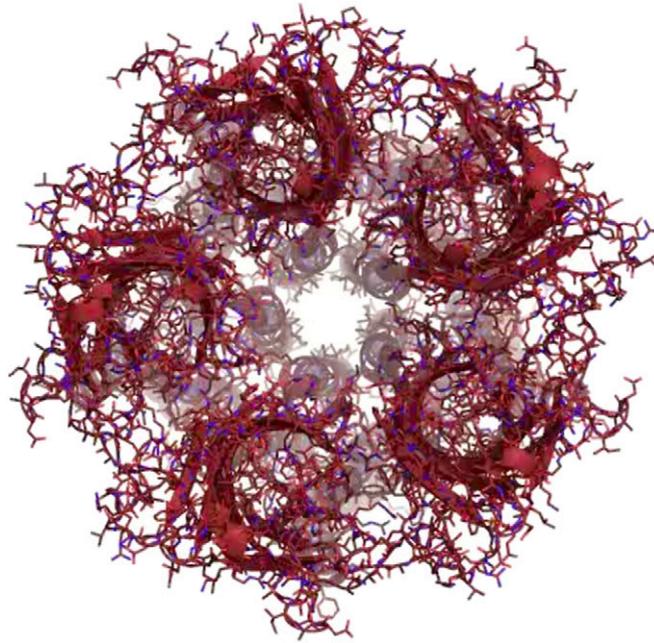
Table S1: Data collection and refinement statistics.

Interface	GLIC-pH4 (Å ²)	GLIC-pH7 (Å ²)
ECD/ECD*	697±20	519±50
ECD/TMD	185±7	135±4
TMD/TMD	1049±30	1130±32

Table S2: Occluded surface areas in Å² for the different kinds of interface of one monomer (ECD/ECD, ECD/TMD and TMD/TMD) in the pH 7 and pH 4 forms. * Loop C was removed from the ECD/ECD interface calculation.

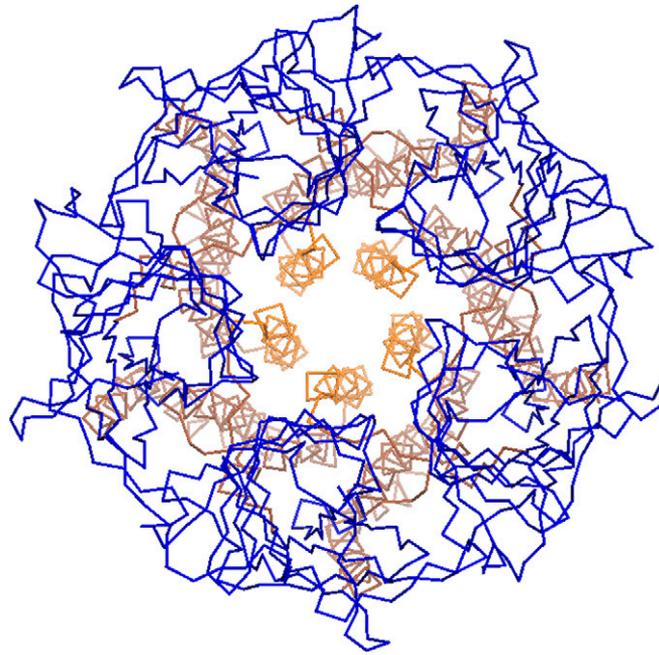
Supporting Information

Sauguet et al. 10.1073/pnas.1314997111



Movie S1. Animation representing the structural variability of the four pentamers of the neutral pH form, as viewed from above the extracellular domain (ECD), looking down the fivefold axis.

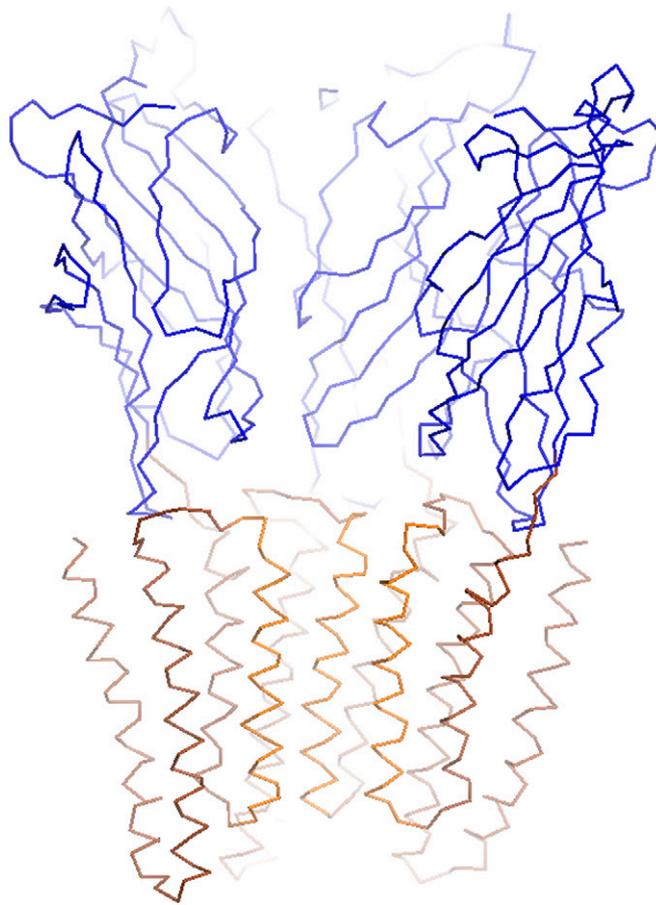
[Movie S1](#)



Movie S2. iENM (1) trajectory from the pH 7 to the pH 4 forms of GLIC, as viewed from above the ECD, looking down the fivefold axis, for the whole pentamer. The ECD is colored in blue and the transmembrane domain in brown, with the exception of M2 helices colored in orange.

1. Tekpinar M, Zheng W (2010) Predicting order of conformational changes during protein conformational transitions using an interpolated elastic network model. *Proteins* 78(11): 2469–2481.

[Movie S2](#)



Movie S3. Same as Movie S2 but viewed from the side, with two subunits removed from the front, for clarity.

[Movie S3](#)

Other Supporting Information Files

[SI Appendix \(PDF\)](#)