



**HAL**  
open science

# Dynamique structurale et allostérie des récepteurs NMDA

Jean-Baptiste Esmenjaud

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Esmenjaud. Dynamique structurale et allostérie des récepteurs NMDA. Neurosciences. Université Paris sciences et lettres, 2018. Français. NNT : 2018PSLEE016 . tel-01938906

**HAL Id: tel-01938906**

**<https://theses.hal.science/tel-01938906>**

Submitted on 29 Nov 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.

# THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres  
PSL Research University

Préparée à l'École Normale Supérieure

Structural dynamics and allostery of NMDA receptors

## Dynamique structurale et allostérie des récepteurs NMDA

Ecole doctorale n°158

Cerveau, cognition, comportement (3C)

Spécialité Neurosciences

Soutenue par  
**JEAN-BAPTISTE ESMENJAUD**  
le 16 juillet 2018

Dirigée par  
**Pierre Paoletti et Antoine Taly**



### COMPOSITION DU JURY :

Président du jury : Dr. CORRINGER

Pr. Catherine ECHEBEST  
Université Paris-Diderot,  
Rapporteuse

Dr. Thomas GRUTTER  
Université de Strasbourg,  
Rapporteur

Dr. Pierre-Jean CORRINGER  
Institut Pasteur,  
Membre du jury

Dr. Ingo GREGER  
MRC Laboratory of Molecular Biology,  
Membre du jury

Dr. Pierre PAOLETTI  
École Normale Supérieure,  
Membre du jury

Dr. Antoine TALY  
Institut de Biologie Physico-Chimique,  
Membre du jury



*L'imprévisible est dans la nature même de l'entreprise scientifique.*  
François Jacob



# Table des matières

Table des matières .....	1
Table des Figures.....	5
Résumé.....	9
Summary .....	11
Remerciements .....	13
Avant-propos.....	15
1. Introduction.....	17
1.1. Les récepteurs canaux, machines moléculaires de la synapse.....	18
1.1.1. La synapse .....	18
1.1.2. Des convertisseurs multimériques .....	21
1.1.3. Diversité des récepteurs ionotropiques du glutamate.....	24
1.2. Rôles physiologiques des récepteurs ionotropiques du glutamate .....	27
1.2.1. Les récepteurs AMPA.....	27
1.2.2. Les récepteurs kainate.....	29
1.2.3. Les récepteurs NMDA .....	30
1.2.3.1. Diversité des récepteurs NMDA .....	30
1.2.3.2. Distribution des sous-unités dans le cerveau et dans le temps .....	31
1.2.3.3. Rôle dans la plasticité synaptique.....	34
1.2.3.4. Implication dans les pathologies du système nerveux.....	37
1.2.4. Les récepteurs orphelins GluD1 et GluD2.....	42

1.3.	Structure des récepteurs ionotropiques du glutamate.....	44
1.3.1.	Architecture globale.....	44
1.3.2.	Assemblage et trafic intracellulaire .....	49
1.3.3.	Le domaine N-terminal ou NTD .....	50
1.3.4.	Le domaine de liaison de l'agoniste ou ABD.....	52
1.3.5.	Le domaine transmembranaire ou TMD .....	54
1.3.6.	Le domaine C-terminal.....	57
1.3.7.	Mécanisme d'activation et de désensibilisation .....	58
1.4.	La modulation allostérique chez les récepteurs NMDA .....	62
1.4.1.	Le concept d'allostérie .....	62
1.4.2.	Spécificité structurale des récepteurs NMDA et allostérie .....	66
1.4.3.	Modulation par les protons .....	69
1.4.4.	Modulateurs se liant dans la région NTD .....	71
1.4.4.1.	Modulation par le zinc .....	72
1.4.4.2.	Modulation par l'ifenprodil.....	76
1.4.4.3.	Modulation par les polyamines .....	80
1.4.5.	Modulation par le potentiel d'oxydo-réduction.....	84
1.4.6.	Modulateurs agissant au niveau de l'ABD .....	85
1.4.7.	Autres modulateurs allostériques .....	87
1.4.8.	Les bloqueurs du pore .....	88
1.4.9.	Pharmacologie des récepteurs trihétéromériques.....	92
1.5.	Analyse cinétique des récepteurs NMDA .....	96
1.5.1.	Modèle cinétique de l'activation d'un récepteur-canal .....	96
1.5.2.	Établissement du modèle cinétique des récepteurs NMDA.....	101
1.5.3.	Comparaison entre les récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B ....	104
1.5.4.	Impact des modulateurs allostériques et de mutations.....	105

---

1.6.	Modélisation des récepteurs ionotropiques du glutamate.....	108
1.6.1.	Modélisation par homologie.....	108
1.6.1.1.	Principe .....	108
1.6.1.2.	Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate.....	110
1.6.2.	Les simulations de dynamique moléculaire.....	111
1.6.2.1.	Principe .....	111
1.6.2.2.	Différents champs de force.....	113
1.6.2.3.	Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate.....	114
1.6.3.	L'analyse en mode normaux.....	119
1.6.3.1.	Principe .....	119
1.6.3.2.	Différents champs de force.....	121
1.6.3.3.	Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate.....	122
2.	Résultats .....	127
2.1.	Analyse des modes normaux du récepteur NMDA entier.....	128
2.1.1.	Contexte.....	128
2.1.2.	Utilisation d'un champ de force tout-atome avec Gromacs .....	130
2.1.3.	Utilisation d'un champ de force élastique avec Bio3D.....	133
2.1.4.	Discussion.....	138
2.2.	Ingénierie d'une famille de récepteurs NMDA photo-activables.....	140
2.2.1.	Contexte.....	140
2.2.2.	Résultats.....	142
2.2.3.	Discussion.....	144
2.3.	An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity .....	146
2.3.1.	Contexte.....	146
2.3.2.	Article soumis.....	150
2.3.3.	Résultats non intégrés à l'article.....	203



## Table des matières

---

2.3.4. Discussion.....	205
Discussion Générale .....	209
3. Annexes .....	215
3.1. Liste des abréviations .....	216
3.2. Liste des mutants testés dans la partie 2.2 .....	218
3.3. Protocole de Western blot.....	219
Bibliographie .....	225

# Table des Figures

Figure 1.1-1 : La synapse.....	20
Figure 1.1-2 : Un représentant de chacune des trois superfamilles de récepteurs ionotropiques.....	23
Figure 1.1-3 : La synapse glutamatergique.....	25
Figure 1.1-4 : Propriétés cinétiques des récepteurs AMPA et NMDA.....	26
Figure 1.2-1 : Les 7 gènes codant pour des sous-unités de récepteur NMDA. ....	31
Figure 1.2-2 : Les propriétés du récepteur NMDA sont déterminées par sa composition en sous-unités.....	32
Figure 1.2-3 : Distribution schématique des sous-unités GluN2 et GluN3 chez la souris à différents stades de développement.....	32
Figure 1.2-4 : Distribution des différents isoformes de GluN1 dans le cerveau de rat adulte révélée par hybridation in situ. ....	33
Figure 1.2-5 : Distribution des sous-unités de récepteurs NMDA dans le cerveau de rat au cours du développement révélée par hybridation in situ. ....	33
Figure 1.2-6 : Le récepteur NMDA, détecteur de coïncidence impliqué dans la plasticité synaptique.....	35
Figure 1.2-7 : Mutations de la sous-unité GluN2A chez des patients présentant des troubles neuro-développementaux.....	38
Figure 1.2-8 : Interaction entre le domaine N-terminal de GluN2 et Cbln1.....	43
Figure 1.3-1 : Topologie et structure des récepteurs ionotropiques du glutamate.....	47
Figure 1.3-2 : Organisation structurale des récepteurs ionotropiques du glutamate. ....	48
Figure 1.3-3 : Le domaine N-terminal de GluN2 présente un twist particulier.....	52
Figure 1.3-4 : Le domaine de liaison de l'agoniste du récepteur AMPA en présence d'un antagoniste compétitif (ZK200775) et du glutamate, l'agoniste naturel.....	54
Figure 1.3-5 : Le domaine transmembranaire des récepteurs-canaux du glutamate.....	55

Figure 1.3-6 : Mécanisme d'activation et de désensibilisation du récepteur AMPA. ....59

Figure 1.3-7 : Structures illustrant l'activation et la désensibilisation du récepteur AMPA.  
.....60

Figure 1.4-1 : Le concept de modulation allostérique pour un récepteur. ....64

Figure 1.4-2 : Les différents types d'effets d'un modulateur allostérique positif.....65

Figure 1.4-3 : Structure du récepteur NMDA montrant la localisation de nombreux sites de liaison de modulateurs allostériques.....67

Figure 1.4-4 : Comparaison du dimère de NTD entre le récepteur homotétramérique GluA2 et le récepteur NMDA GluN1/GluN2B. ....68

Figure 1.4-5 : Comparaison de l'arrangement de la couche ABD entre le récepteur NMDA GluN1/GluN2B et le récepteur AMPA GluA2.....68

Figure 1.4-6 : Comparaison de l'architecture globale des récepteurs AMPA et NMDA. ..69

Figure 1.4-7 : Les différences de probabilité d'ouverture entre les différentes sous-unités GluN2 sont liées au domaine NTD et au lien qui relie ce domaine à l'ABD. ....72

Figure 1.4-8 : Le zinc est un modulateur allostérique négatif des récepteurs NMDA. ....74

Figure 1.4-9 : Zinc libre dans le cerveau révélé par histochimie. ....75

Figure 1.4-10 : Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B sont sensibles à l'ifenprodil grâce à leur NTD. ....78

Figure 1.4-11 : Comparaison de l'arrangement des dimères de NTD GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. ....79

Figure 1.4-12 : La spermine, modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA.....82

Figure 1.4-13 : Conformation active du dimère de NTD chez le récepteur NMDA.....83

Figure 1.4-14 : Site de modulation des récepteurs NMDA par le potentiel d'oxydoréduction.....84

Figure 1.4-15 : Modulateurs allostériques des récepteurs NMDA agissant au niveau de la machinerie d'activation (ABD et TMD). ....86

Figure 1.4-16 : GNE-6901, un modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A agissant au niveau de l'ABD. ....87

Figure 1.4-17 : Mécanisme de blocage du pore chez le récepteur NMDA.....91

Figure 1.4-18 : Propriétés fonctionnelles des trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B. ..94

Figure 1.4-19 : Structure du trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B. ....95

Figure 1.5-1 : Les différentes configurations utilisées en patch-clamp.....97

Figure 1.5-2 : Évolution du schéma cinétique décrivant l'activation du récepteur nicotinique à l'acétylcholine depuis 1957. ....	99
Figure 1.5-3 : Les récepteurs AMPA possèdent différents niveaux de conductance unitaire en fonction du nombre d'agonistes liés.....	100
Figure 1.5-4 : Activité du récepteur NMDA unitaire GluN1/GluN2A.....	102
Figure 1.5-5 : Modèles cinétiques de l'activation du récepteur NMDA.....	103
Figure 1.5-6 : Comparaison de la cinétique d'activation des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. ....	105
Figure 1.5-7 : Modèles cinétiques de l'activation des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. ....	107
Figure 1.6-1 : Comparaison entre l'identité de séquence et le rmsd pour les protéines membranaires et solubles. ....	109
Figure 1.6-2 : Distribution d'énergie libre des ABDs des récepteurs canaux du glutamate en fonction de leur conformation. ....	116
Figure 1.6-3 : 'Targeted molecular dynamics simulation' du mécanisme d'ouverture du récepteur NMDA.....	117
Figure 1.6-4 : Étude du mode de liaison du MK-801 par simulation de dynamique moléculaire. ....	119
Figure 1.6-5 : Utilisation de l'approximation harmonique pour l'analyse de modes normaux.....	121
Figure 1.6-6 : L'ouverture/fermeture et le twist/détwist : deux principaux modes de vibration des domaines 'clamshell'. ....	124
Figure 2.1-1 : Conception d'un modèle de récepteur NMDA de rat complet.....	129
Figure 2.1-2 : Tentative de minimisation du récepteur NMDA complet dans un champ de force de mécanique moléculaire avec GROMACS.....	132
Figure 2.1-3 : Comparaison des modes de vibration du récepteur NMDA entier dans différents champs de force élastiques.....	134
Figure 2.1-4 : Étude des modes normaux d'un récepteur NMDA complet dans un réseau élastique.....	135
Figure 2.1-5 : Comparaison des modes de vibration du récepteur NMDA entier à partir de deux états conformationnels distincts de la couche NTD. ....	137

Figure 2.2-1 : Classification des différentes techniques de contrôle des canaux ioniques par la lumière.....141

Figure 2.2-2 : L'ouverture du canal trimérique P2X portant la mutation P329C par illumination à 440 nm après traitement au BMA.....142

Figure 2.2-3 : Ingénierie d'un récepteur NMDA photoactivable.....143

Figure 2.3-1 : Le domaine extracellulaire supposé actif du récepteur NMDA. ....147

Figure 2.3-2 : Diagramme du fonctionnement d'iMODFIT.....149

Figure 2.3-3 : Détection du pont disulfure introduit à l'interface 5 pour piéger la conformation inactive chez les récepteurs GluN1/GluN2B.....204

Figure 2.3-4 : Détection des ponts disulfures introduits à l'interface 5 pour piéger différentes conformations chez les récepteurs GluN1/GluN2A.....205

## Résumé

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont responsables de la vaste majorité de la neurotransmission excitatrice rapide dans le système nerveux central. Parmi eux, les récepteurs NMDA (rNMDA) sont les médiateurs de la plasticité synaptique, fondement cellulaire des processus d'apprentissage et de mémoire. Leurs dysfonctionnements sont impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, l'épilepsie et la schizophrénie.

Les rNMDA forment des complexes hétérotétramériques massifs (>500 kDa) dotés de propriétés allostériques uniques grâce à un ensemble de 8 domaines extracellulaires bilobés organisé en deux strates superposées : la couche de domaines N-terminaux (NTD) et la couche de domaines de liaison de l'agoniste (ABD). Malgré un nombre croissant de structures complètes de rNMDA, le mécanisme de transduction permettant aux interactions entre ces domaines de contrôler l'activité du récepteur restait inconnu.

En combinant analyse expérimentale et computationnelle, nous montrons qu'un mouvement de roulis à l'interface entre les deux dimères de la couche d'ABD est un déterminant clé du processus d'activation et de modulation des rNMDA. Cette rotation des deux dimères d'ABD constitue un commutateur conformationnel qui règle l'ouverture du canal en fonction de la conformation des NTD situés à l'opposé.

Ce travail révèle comment des changements conformationnels concertés entre couches de domaines gouvernent l'activité des rNMDA. Il illumine notre compréhension d'un récepteur synaptique majeur du système nerveux central et ouvre la voie à la conception de nouveaux agents pharmacologiques ciblant le mécanisme allostérique élucidé.



## Summary

Ionotropic glutamate receptors are responsible for the vast majority of fast excitatory neurotransmission in the central nervous system. Among them, NMDA receptors (NMDARs) are key mediators of synaptic plasticity, which is considered as the cellular basis of learning and memory. NMDAR dysfunction is implicated in numerous neurological and psychiatric brain disorders such as Alzheimer and Parkinson's disease, epilepsy and schizophrenia.

NMDAR form massive heterotetrameric complexes (>500 kDa) endowed with unique allosteric capacity provided by a cluster of eight extracellular clamshell-like domains arranged as two superimposed layers: the N-terminal domain (NTD) layer and the agonist-binding domain (ABD) layer. Despite an increasing number of full-length NMDAR structures, the transduction mechanism by which these domains interact in an intact receptor to control its activity remained poorly understood.

Combining experimental and in silico analysis, we identify a rolling motion at an interface between the two constitute dimers in the ABD layer as a key determinant in NMDAR activation and modulation pathways. This rotation of the two ABD dimers acts as a conformational switch that tunes channel opening depending on the conformation of the membrane-distal NTD layer.

This work unveils how NMDAR domains move and operate in a concerted manner to transduce conformational changes between layers and command receptor activity. It illuminates our understanding of a major synaptic receptor of the central nervous system and paves the way for the development of new pharmacological tools targeting the elucidated allosteric mechanism.





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail : Catherine Etchebest et Thomas Grutter qui sont rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que Pierre-Jean Corringer et Ingo Greger, examinateurs. Je pense également à Patrick Fuchs, qui a été avec Pierre-Jean Corringer membre de mon comité de suivi de thèse. Les recommandations de ce comité ont été profitables.

Je souhaite ensuite bien sûr remercier mes directeurs de thèse, Antoine et Pierre. Ils ont tous deux toujours été à la fois rigoureux, enthousiastes et spirituels, trois qualités chères à mes yeux. Antoine, merci pour ta disponibilité et ta réactivité. Tes explications et conseils ont toujours été très didactiques, avec un retour aux fondamentaux à chaque fois que cela était nécessaire. Je ne t'ai pas sollicité aussi souvent que j'aurais pu, surtout quand je disparaissais pour faire avancer 'les manips' pendant des semaines mais j'ai beaucoup apprécié ta direction et ton efficacité. Pierre, je mesure ma chance d'avoir partagé ton bureau pendant toute la durée de ma thèse. Cela m'a permis de profiter régulièrement de ton érudition, de ton recul et de tes remarques affûtées sur mon travail malgré tes responsabilités toujours plus importantes. Je garderai un excellent souvenir de nos discussions conceptuelles du soir qui m'ont mené occasionnellement à rater un train ou un spectacle.

Je voudrais aussi remercier nos collaborateurs américains, Lonnie Wollmuth et Kelvin Chan, pour leur implication dans notre travail. Leur appui dans nos recherches a été précieux et je regrette de ne pas avoir pu les rencontrer dans la vraie vie.

Merci également à tous les membres de l'Institut de biologie physico-chimique que j'ai croisés. Même si j'ai peu interagi avec eux, j'ai l'impression que cet institut est un lieu où l'on combine utilement travail agréable et productif.

Merci aussi aux membres de l'équipe NMDA : Alison, Andrea, Benjamin, Chloé, David, Laura, Laetitia, Mariano, Meilin, Mélissa, Romain, Simon, Teddy et Viktoria. Sachez que même si ça n'était pas forcément apparent du fait de mon naturel détendu, ces années avec vous auront été intenses. Simon, merci pour le sandwich, Melissa, je ne désespère pas que tu viennes un jour à vélo au lieu de prendre ton RER inopérant. Je remercie particulièrement Benjamin pour son humour falot et Teddy pour son efficacité à la fois dans mon projet et à côté. C'est entièrement grâce à son coaching de qualité que j'ai pu courir mon premier marathon. Mon quotidien ne s'est pas limité à notre équipe et je remercie également toute la section neuro et tous les membres de l'Institut de Biologie de l'École normale supérieure.

Je suis également très reconnaissant envers les équipes enseignantes auprès desquelles j'ai effectué mon monitorat : Pascale Riolland-Lefevre, Émilie Guillaume, Guillaume Barthole et Gérald Peyroche à l'ENS Cachan et François Huetz, Jean-Pierre Levraud et Gonzalo Ortiz à l'Institut Pasteur. Ce travail m'a conforté dans mon choix de poursuivre ma carrière vers l'enseignement. Merci également à Alain Bessis de m'avoir proposé de participer au jury du concours de l'ENS.

Un grand merci au groupe universitaire de montagne et de ski, dont je suis très heureux de faire partie. C'est un club convivial et engagé qui me correspond particulièrement bien et qui m'a permis d'aller périodiquement chercher une bouffée d'oxygène en escalade ou en alpinisme à ski dans les hauteurs alpines. Merci aussi au club œnologie de l'ENS.

Bien évidemment, merci à mes amis, en particulier à mes amis colocataires, à ma famille et à Constance.

Et pour terminer, merci à toi, lecteur de cette thèse.

# Avant-propos

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, sous la direction de Pierre Paoletti, et à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, sous la direction d'Antoine Taly.

Le manuscrit est divisé en deux grands chapitres. Le premier est une introduction générale sur les récepteurs-canaux du glutamate, plus particulièrement axée sur les récepteurs NMDA. L'importance fonctionnelle de ces récepteurs est tout d'abord abordée : leurs rôles à la synapse, leur diversité, leur distribution dans le cerveau et leur physiologie normale et pathologique sont présentés. Ensuite sont détaillées leur architecture moléculaire et leur richesse pharmacologique, en faisant le lien entre leurs particularités structurales et leurs propriétés allostériques. Enfin, le modèle cinétique de leur mécanisme d'activation et l'apport des études computationnelles à leur compréhension sont exposés.

Le deuxième chapitre, organisé en trois sections, présente les résultats obtenus au cours de ma thèse et les discute. Il comporte deux courtes sections concernant des projets dont les résultats n'ont pas été publiés. La première porte sur l'analyse des modes normaux du récepteur NMDA, la seconde détaille une étude visant à créer une famille de récepteurs photo-activables par une approche de pharmacologie optogénétique. La troisième section, contenant les résultats les plus conséquents, traite des mécanismes de transition allostérique au sein du récepteur. Une rotation entre domaines au sein du récepteur, réglant à fois son activation et l'action de ses modulateurs allostérique y est caractérisée. Un article finalisé et qui vient juste d'être soumis pour publication y est inséré.



# **1. Introduction**

## 1.1. Les récepteurs canaux, machines moléculaires de la synapse

### 1.1.1. La synapse

Grâce à la coloration argentique de Golgi, le neuroanatomiste espagnol Santiago Ramón y Cajal mit en évidence au XIXe siècle que les neurones (ou cellules nerveuses) étaient des entités cellulaires séparées par de fins espaces. Le terme de synapse, du grec *συν* (« syn », ensemble) et *ἄπτειν* (« haptain », lier) fut introduit par Sherrington en 1897 pour dénommer ces espaces (Tansey 1997).

Les synapses sont des zones de contact fonctionnel entre un neurone et une autre cellule, neuronale ou non (Figure 1.1-1). On distingue deux types de synapses : les synapses électriques, avec accollement des membranes des neurones et transmission directe du signal électrique entre les deux cellules, et les synapses chimiques, très majoritaires, qui mettent un jeu un messager chimique intermédiaire pour transmettre l'information.

La synapse chimique est polarisée, elle permet à un neurone dit 'pré-synaptique', de transmettre un signal électrique à la cellule réceptrice dite 'post-synaptique'. L'arrivée d'un potentiel d'action au niveau pré-synaptique déclenche la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Ces molécules se fixent alors sur les récepteurs-canaux localisés au niveau de la membrane post-synaptique, déclenchant une dépolarisation par ouverture de ces canaux ioniques. Cette dépolarisation est ensuite intégrée au niveau du soma permettant le traitement de l'influx nerveux. Le neurotransmetteur n'est présent dans la fente synaptique que très brièvement, il est immédiatement dilué par diffusion, pompé par les cellules alentours ou détruit par

réaction enzymatique. L'ensemble de la transmission synaptique ne dure que quelques millisecondes.

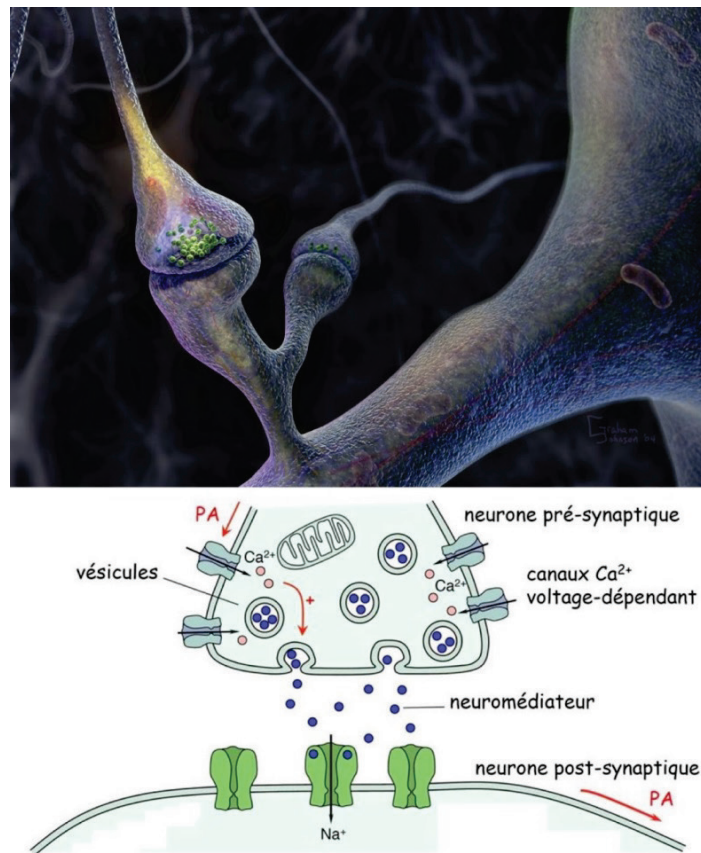
On distingue les synapses excitatrices, qui stimulent la cellule post-synaptique, des synapses inhibitrice qui en diminuent l'activité. Cette propriété étant directement liée au neurotransmetteur mis en jeu chez les mammifères, on peut classer les synapses en fonction de ce dernier. La synapse majoritaire du système nerveux central est la synapse excitatrice glutamatergique où l'acide aminé L-glutamate est le neurotransmetteur.

#### Encart : La controverse Cajal-Golgi

La découverte de Cajal fut décisive pour sa théorie neuronale, qui s'opposait alors à la théorie réticulaire selon laquelle le système nerveux était un réseau de fibres ininterrompu. Camillo Golgi et Santiago Ramón y Cajal partagèrent en 1906 le prix Nobel de physiologie ou médecine en reconnaissance de leurs travaux sur la structure du système nerveux. C'était la première fois qu'un prix Nobel était attribué conjointement à deux scientifiques et les deux savants qui ne s'étaient jamais rencontrés encore se retrouvèrent donc à Stockholm.

Cependant, même si les découvertes de Cajal avaient été permises grâce à sa technique de coloration, Golgi eut le sentiment d'être le scientifique du passé face à Cajal. N'acceptant pas de se soumettre à la théorie neuronale, il profita de sa conférence, donnée la veille de celle son confrère et intitulée « La doctrine du neurone. Théorie et faits. », pour lutter contre l'idée du neurone comme unité fonctionnelle et centrale du système nerveux. Le lendemain, malgré l'affront, Cajal n'oublia pas de faire mention de l'apport décisif de Golgi pour les recherches sur le système nerveux, et les siennes en particulier (Barbara 2010).





### Figure 1.1-1 : La synapse.

En haut, une vue d'artiste d'une synapse excitatrice illustrant l'arrivée d'un potentiel d'action couleur flamme et les vésicules synaptiques contenant le neurotransmetteur en vert. L'image a été produite par intégration dans un logiciel de modélisation 3D de micrographies ultra fines de tranches de cerveau auxquelles textures et couleurs ont été rajoutées, la majorité des interactions neuronales ont été supprimées (Visualization challenge 2005 du journal Science, crédit Graham Johnson Medical Media, Boulder, Colorado). En bas, récapitulatif de la propagation du potentiel d'action au passage d'une synapse. L'arrivée du potentiel d'action conduit à une dépolarisation du bouton pré-synaptique déclenchant l'activation des canaux calciques voltage-dépendant. L'entrée d'ions calcium dans la cellule provoque la libération du neurotransmetteur (ou neuromédiateur) dans la fente synaptique par exocytose de vésicules qui le contiennent. Le neurotransmetteur se fixe sur les récepteurs-canaux localisés sur la face post-synaptique, déclenchant l'ouverture de leur canal et une entrée de courant dans la cellule.

### 1.1.2. Des convertisseurs multimériques

Les récepteurs-canaux (ou récepteurs ionotropiques), sont des canaux ioniques activés par la liaison d'un agoniste appelé neurotransmetteur (Alexander et al. 2011). Ce sont des protéines membranaires qui contiennent un pore permettant un flux sélectif d'ions à travers la membrane de la cellule. La liaison du neurotransmetteur sur un site de la protéine dit 'orthostérique', déclenche un changement conformationnel aboutissant à l'ouverture du canal et donc au passage d'ions. Ainsi, ils convertissent un signal chimique (concentration en agoniste) en signal électrique (courant transmembranaire et changement du potentiel de membrane). Les récepteurs-canaux sont majoritairement localisés au niveau post-synaptique et le signal électrique produit par leur ouverture en réponse à la libération pré-synaptique de neurotransmetteur est rapide et phasique.

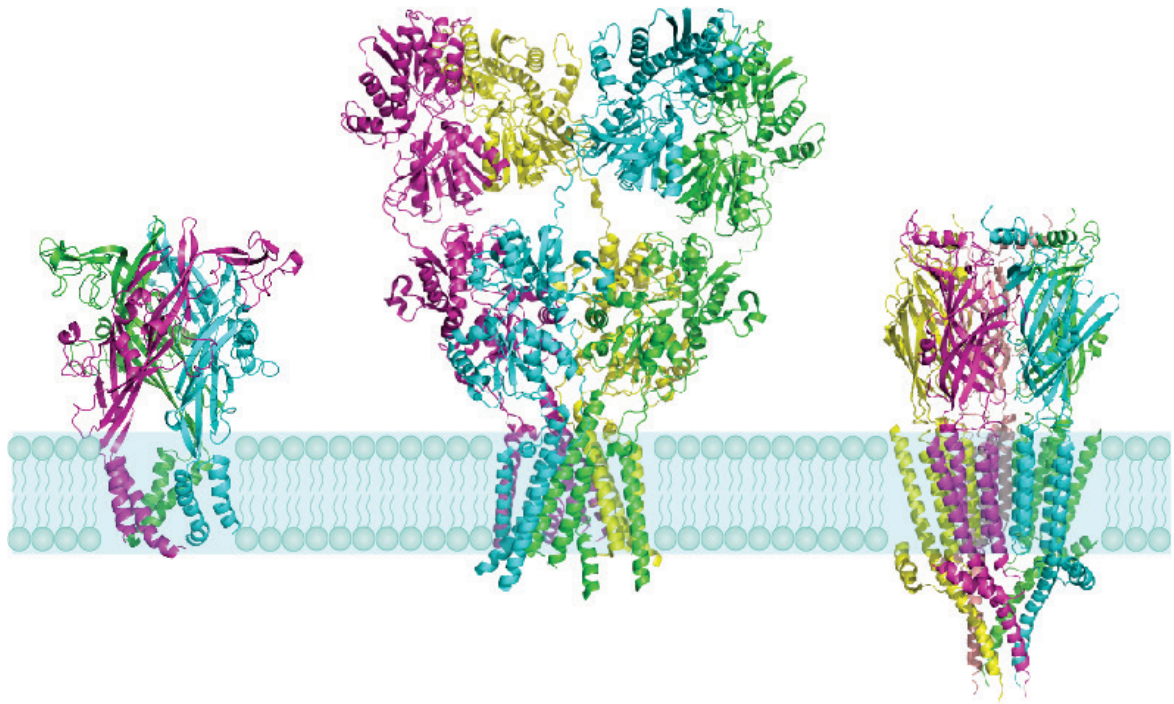
En prenant l'exemple du récepteur AMPA, dont la masse moléculaire est de 380000 Da environ et dont l'agoniste, le L-glutamate a une masse moléculaire de 150 Da, il faut imaginer que la liaison de cette petite molécule sur le mastodonte déclenche l'ouverture d'un canal transmembranaire à plus de 30 Å de distance en moins d'une milliseconde.

Les récepteurs canaux sont multimériques, c'est-à-dire constitués de plusieurs sous-unités et sont classés dans trois super-familles en fonction du nombre de monomères qui les composent (Figure 1.1-2). On distingue :

- Les récepteurs canaux pentamériques (pLGIC), qui comprennent des canaux sélectifs des cations, excitateurs : le récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) et le récepteur à la sérotonine 5-HT<sub>3</sub> et des canaux sélectifs pour les anions chlorures, généralement inhibiteurs : le récepteur à la glycine (GlyR) et le récepteur à l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique ou GABA (GABA<sub>A</sub>R). Cette super-famille est également appelée récepteurs à 'Cys-loop' en raison d'une boucle caractéristique à pont disulfure présente dans le domaine extracellulaire de leurs sous-unités.
- Les récepteurs canaux tétramérique qui sont les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR). Le canal est sélectif aux cations, ce sont des récepteurs excitateurs.

- Les récepteurs trimériques de type P2X activés par l'ATP extracellulaire et qui sont également excitateurs.

Les sous-unités qui composent les récepteurs canaux sont encodées par de nombreux gènes. On trouve par exemple 19 gènes différents de sous-unités de récepteur GABA<sub>A</sub> chez l'homme. Pour les récepteurs NMDA (voir 1.1.3), plus de 10 sous-types différents ont été identifiés (Figure 1.2-1 et Figure 1.2-3). Ceci permet une diversité combinatoire qui aboutit à une multitude de sous-types de récepteurs, chacun ayant des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes (Figure 1.2-2), ainsi que des patrons d'expression spatiale et temporelle variés (Figure 1.2-4 et Figure 1.2-5). Cette diversité permet une adaptation de chaque population de récepteur à sa fonction précise. L'étude de chaque sous-population nécessite de nouveaux outils permettant de les cibler spécifiquement afin de comprendre leur pertinence physiologique. L'objectif est également d'exploiter cette diversité à des fins thérapeutiques, car le ciblage d'un sous-type en particulier impliqué dans une maladie permet une meilleure efficacité et des effets secondaires moindres qu'en touchant tous les récepteurs.



**Figure 1.1-2 : Un représentant de chacune des trois superfamilles de récepteurs ionotropiques.**

À gauche le récepteur trimérique P2X<sub>4</sub> qui lie l'ATP (Hattori and Gouaux 2012), au centre le récepteur tétramérique AMPA qui lie le glutamate (Sobolevsky et al. 2009) et à droite le récepteur pentamérique 5-HT<sub>3</sub> qui lie la sérotonine (Hassaine et al. 2014). Lors de la liaison du neurotransmetteur, le canal situé dans la partie transmembranaire s'ouvre et permet le passage d'ions. La longueur du récepteur présenté au centre est de 18 nm avec la partie transmembranaire, ce qui signifie qu'il s'avance au moins jusqu'à la moitié de la fente synaptique qui mesure généralement 15 à 25 nm (Savtchenko and Rusakov 2007).

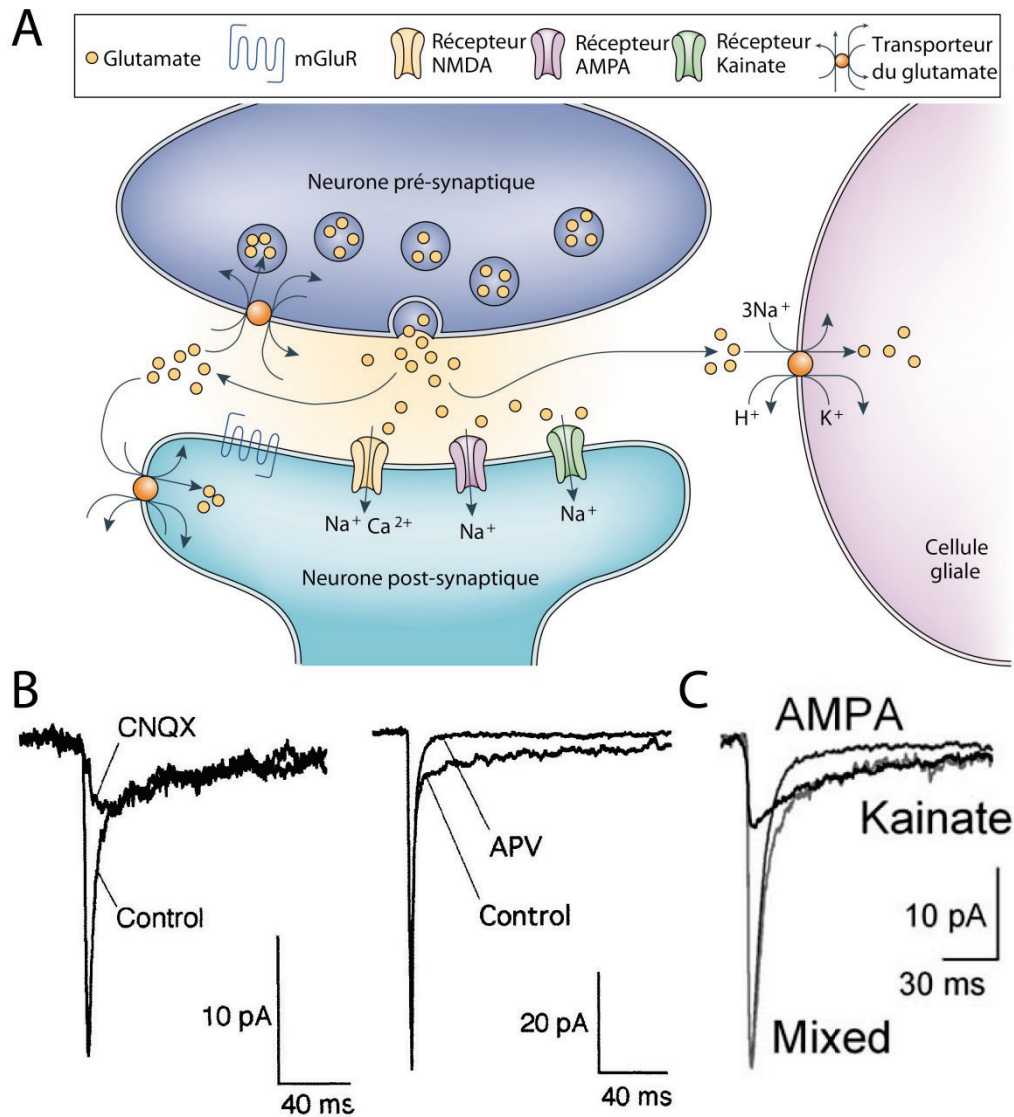
### 1.1.3. Diversité des récepteurs ionotropiques du glutamate

Les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs) forment des complexes tétramériques massifs qui s'ouvrent lors de la fixation du neurotransmetteur glutamate, laissant passer un courant cationique dépolarisant : le potentiel excitateur post-synaptique (EPSP pour 'excitatory post-synaptic potential'). Il existe plusieurs types de récepteurs ionotropiques du glutamate classés selon leur agoniste synthétique spécifique :

- l'AMPA (ou  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid)
- le kainate
- le NMDA (ou N-Méthyl-D-aspartate)

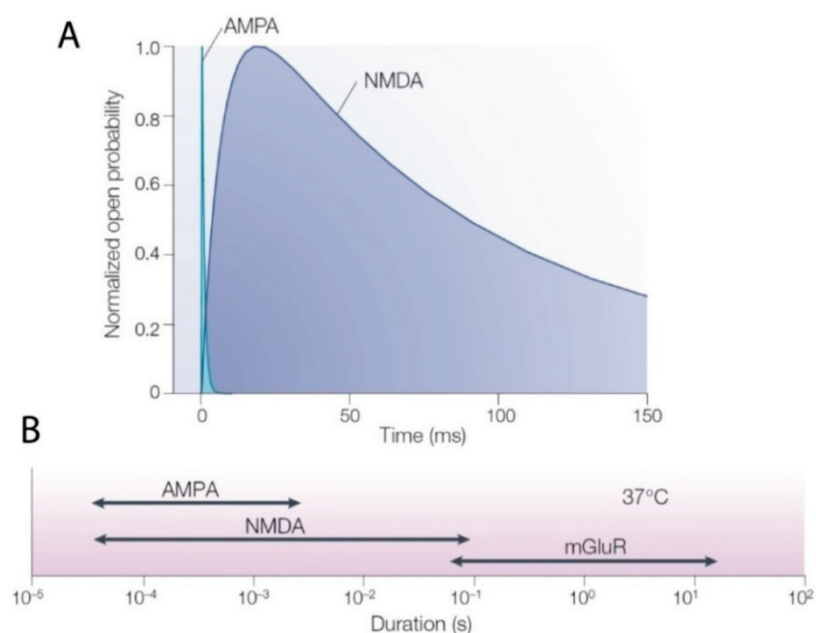
Une synapse typique contient des récepteurs AMPA et NMDA, certaines synapses contiennent en sus des récepteurs kainate. L'utilisation d'antagonistes spécifiques de chacun d'eux permet d'isoler leur contribution dans l'EPSP : les récepteurs AMPA et kainate sont responsables d'une réponse immédiate et rapide dont l'ordre de grandeur est la milliseconde, tandis que les récepteurs NMDA ont une activation plus lente, qui se prolonge plusieurs dizaines ou centaines de millisecondes après la libération du neurotransmetteur alors que la concentration de ce dernier n'augmente que très transitoirement (Figure 1.1-3 et Figure 1.1-4, Attwell and Gibb 2005).

Différents gènes ont été identifiés et clonés pour chaque sous-type de récepteur-canal au glutamate. Les récepteurs tétramériques sont donc le résultat de la combinatoire de ces différents gènes en fonction des associations possibles, combinatoire encore complexifiée par la présence d'épissage alternatif et d'édition de l'ARN pour certaines sous-unités. 18 gènes ont ainsi été identifiés, dont deux appartiennent à des récepteurs dits orphelins car ne formant pas de canaux activables (Table 1).



**Figure 1.1-3 : La synapse glutamatergique.**

**A** Schéma d'une synapse glutamatergique faisant apparaître les différents récepteurs du glutamate (Attwell and Gibb 2005). Voir Figure 1.1-1 pour la description de la transmission synaptique. Le transporteur du glutamate permet de pomper le glutamate hors de la fente synaptique. Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont responsable d'une signalisation plus lente. **B** Distinction entre le courant lié aux récepteurs NMDA et le courant lié aux récepteurs AMPA et kainate grâce à des inhibiteurs lors de potentiels post-synaptiques excitateurs miniatures : le CNQX inhibe les récepteurs AMPA et kainate tandis que l'APV inhibe les récepteurs NMDA (Watt et al. 2000). **C** Distinction entre les courants portés par les récepteur AMPA et kainate à une synapse de fibre moussue de l'hippocampe (Mott et al. 2008).



**Figure 1.1-4 : Propriétés cinétiques des récepteurs AMPA et NMDA.**

**A** Décours temporel d'activation des récepteurs AMPA et NMDA en réponse à une exposition à 1 mM de glutamate pendant 0,3 ms. La probabilité d'ouverture a été normalisée à la probabilité d'ouverture maximale de chaque canal. Les récepteurs AMPA s'activent extrêmement rapidement et très brièvement, dans une échelle de temps d'1 ms tandis que les récepteurs NMDA ont un déroulement temporel beaucoup plus lent et peuvent s'ouvrir pendant plusieurs dizaines de ms. **B** Fenêtres temporelles d'augmentation de la concentration en glutamate auxquelles les récepteurs AMPA, NMDA et les récepteurs métabotropiques du glutamate mGluR sont sensibles. Les récepteurs-canaux du glutamate sont responsables de la transmission synaptique rapide (échelle de temps de la milliseconde) mais les récepteurs NMDA sont également sensibles à des stimulations jusqu'à 100 fois plus longues (Attwell and Gibb 2005).

Nonhuman genes are represented by lowercase HUGO symbols (e.g., Gria1).

IUPHAR Name	HUGO Symbol	Common Names	Human Chromosome	Amino Acids in Longest Splice Variant
GluA1	GRIA1	GluR1, GluRA	5q31.1	906
GluA2	GRIA2	GluR2, GluRB	4q32-q33	901
GluA3	GRIA3	GluR3, GluRC	Xq25-q26	894
GluA4	GRIA4	GluR4, GluRD	11q22	902
GluK1	GRIK1	GluR5	21q22.11	918
GluK2	GRIK2	GluR6	6q16.3-q21	908
GluK3	GRIK3	GluR7	1p34-p33	919
GluK4	GRIK4	KA1	11q22.3	956
GluK5	GRIK5	KA2	19q13.2	981
GluN1	GRIN1	NMDAR1, NR1, GluR $\epsilon$ 1	9q34.3	938
GluN2A	GRIN2A	NMDAR2A, NR2A, GluR $\epsilon$ 1	16p13.2	1464
GluN2B	GRIN2B	NMDAR2B, NR2B, GluR $\epsilon$ 2	12p12	1484
GluN2C	GRIN2C	NMDAR2C, NR2C, GluR $\epsilon$ 3	17q25	1236
GluN2D	GRIN2D	NMDAR2D, NR2D, GluR $\epsilon$ 4	19q13.1-qter	1336
GluN3A	GRIN3A	NR3A	9q31.1	1115
GluN3B	GRIN3B	NR3B	19p13.3	1043
GluD1	GRID1	$\delta$ 1, GluR delta-1	10q22	1009
GluD2	GRID2	$\delta$ 2, GluR delta-2	4q22	1007

**Table 1 : Les différents gènes des récepteurs ionotropiques du glutamate.** (Traynelis et al. 2010).

## 1.2. Rôles physiologiques des récepteurs ionotropiques du glutamate

### 1.2.1. Les récepteurs AMPA

Dans le système nerveux central des mammifères, la vaste majorité de la neurotransmission excitatrice rapide est réalisée par les récepteurs AMPA. Ils sont perméables aux cations monovalents  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  et ont un potentiel d'inversion proche de 0 mV (Jahr and Stevens 1987). Ces récepteurs sont formés par différentes combinaisons de quatre sous-unités issues de 4 gènes, GluA1 à GluA4, aux propriétés fonctionnelles distinctes. Les sous-unités peuvent s'associer en homomères ou en hétéromères ce qui aboutit à une grande diversité moléculaire. Celle-ci est encore renforcée par l'épissage alternatif des transcrits, qui existent tous en deux versions, dénommées flip et flop. (Sommer et al. 1990). Les gènes GluA2 et GluA4 sont aussi sujets à un épissage au niveau de leur domaine C-terminal (Kohler et al. 1994). La présence de la sous-unité GluA2 au sein du tétramère est critique car elle rend le canal imperméable au calcium. En effet, dans cette sous-unité, une glutamine du pore est éditée en arginine au niveau d'un site dénommé Q/R, introduisant une charge positive qui empêche le passage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  (Burnashev et al. 1992). Les récepteurs AMPA sont également soumis à des modifications post-traductionnelles, notamment des phosphorylations au niveau de leur région C-terminale intracellulaire.

L'expression de chaque sous-unité est régulée durant le développement, spécifique à certaines régions cérébrales et à certains types cellulaires, et dépend de l'activité. Dans les cellules principales du cerveau antérieur dont font partie l'hippocampe et le cortex, les sous-unités prédominantes sont GluA1 et GluA2 (Lu et al. 2009). La sous-unité GluA2,



qui rend le récepteur imperméable au calcium est en revanche peu présente dans les stades précoces de développement, où les récepteurs sont formés majoritairement des sous-unités GluA1 et GluA4 (Pickard et al. 2000, Kumar et al. 2002, Miguez et al. 2007). Le calcium est en effet un messager pléiotrope qui a un rôle clé dans les signaux de plasticité et de maturation synaptique, et il joue un rôle prépondérant dans l'établissement des circuits au cours des premières étapes de développement.

À une synapse canonique, les récepteurs sont concentrés sur la membrane post-synaptique, au niveau de l'épine dendritique. La libération vésiculaire de glutamate et sa liaison aux récepteurs AMPA déclenche leur ouverture rapide, transitoire et très brève (1 ms), en raison d'une part de la désensibilisation quasi-instantanée de ces récepteurs et d'autre part de la dilution immédiate du glutamate dans la fente synaptique. L'amplitude et la cinétique de la réponse sont dictées par le nombre de récepteurs et leur composition, deux paramètres qui varient en fonction de nombreux facteurs (localisation de la synapse dans le cerveau, type cellulaire du neurone, âge, plasticité, etc.). Les interneurons inhibiteurs des circuits corticaux expriment généralement la sous-unité GluA1 qui permet une réponse rapide de moins d'une milliseconde permettant le déclenchement de potentiels d'action dans une fenêtre temporelle réduite. Cette sous-unité est souvent également impliquée dans les cellules qui régulent des activités rythmiques (Isaac et al. 2007). La composition et le nombre des récepteurs AMPA à une synapse sont des déterminants majeurs de l'intensité et de la forme de sa réponse à la libération de glutamate, mais la localisation de la synapse ainsi que la capacité du dendrite à propager l'EPSP sont également des paramètres importants qui pourront changer le déroulement temporel de la réponse au niveau du soma où celle-ci est intégrée (Bloodgood and Sabatini 2008). Il faut noter que pour un même neurone, la composition en sous-unités des récepteurs AMPA peut différer d'une synapse à l'autre, certaines sous-unités étant adressées différemment. Chez les neurones du corps genouillé latéral par exemple, GluA1 est majoritaire aux synapses rétino-géniculées tandis que GluA4 est majoritaire aux synapses cortico-géniculées malgré l'existence de réserves intracellulaires de GluA1 aux deux synapses (Kielland et al. 2009). Enfin, un rôle métabotropique a été avancé pour les récepteurs AMPA (Schenk and Matteoli 2004).

## 1.2.2. Les récepteurs kainate

Les récepteurs kainate sont encodés par 5 gènes différents nommés GluK1 à GluK5. Les sous-unités GluK1 à GluK3 forment des récepteurs homomériques fonctionnels tandis que les sous-unités GluK4 et GluK5 ne peuvent contribuer que dans des hétéromères contenant les autres sous-unités. Ces récepteurs, perméables aux cations monovalents  $K^+$  et  $Na^+$  comme tous les récepteurs-canaux du glutamate, ont également une faible perméabilité au calcium lorsqu'ils ne contiennent pas les sous-unités GluK1 ou GluK2 éditées. Ces deux sous-unités peuvent en effet, comme la sous-unité GluA2 du récepteur AMPA, subir un processus d'édition au niveau du site Q/R qui remplace une glutamine du pore par une arginine, aboutissant à une imperméabilité aux ions  $Ca^{2+}$ .

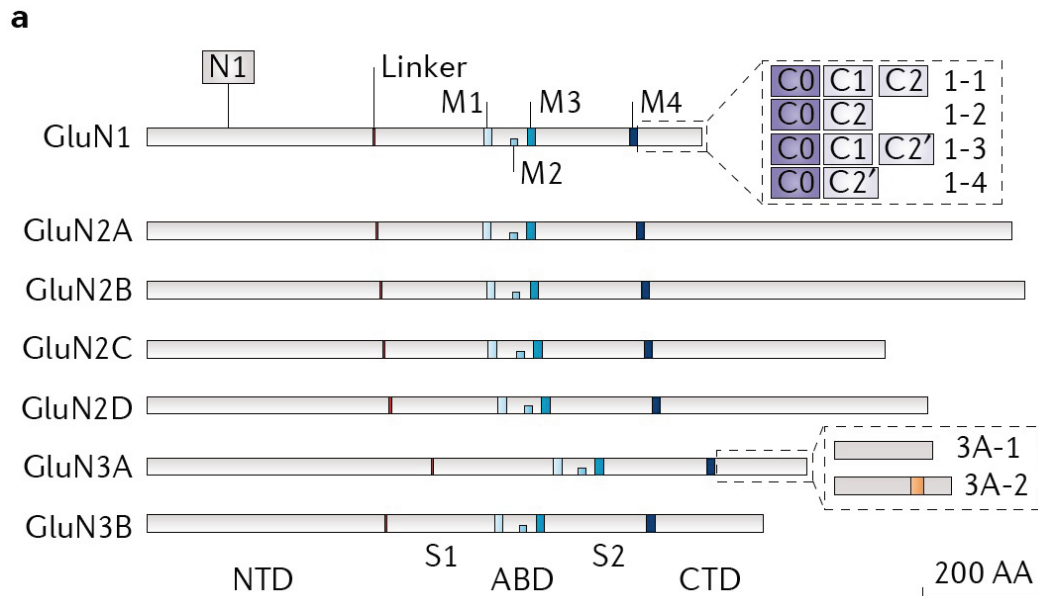
Les récepteurs kainate ont des fonctions variées en lien avec leurs propriétés moléculaires et cinétiques (Lerma and Marques 2013). Ils possèdent des cinétiques d'activation plus lentes que les récepteurs AMPA, permettant une dépolarisation de la membrane plus longue. On les trouve au niveau pré-synaptique et au niveau post-synaptique. Au niveau post-synaptique, ils sont exprimés au cours du développement à certaines synapses avant que les récepteurs AMPA n'y soient exprimés, ce qui suggère un rôle dans l'établissement du circuit. C'est notamment le cas aux synapses thalamo-corticales ou à celles du cortex perirhinal (Kidd and Isaac 1999, Isaac et al. 2007). Le passage de récepteurs kainate à des récepteurs AMPA raccourcit la fenêtre de dépolarisation permettant l'activation des récepteurs NMDA (Voir Figure 1.2-6) impactant les phénomènes de plasticité synaptique qui y sont liés (Bannister et al. 2005, Daw et al. 2006). Les récepteurs kainate sont aussi exprimés de façon concomitante des récepteurs AMPA, comme c'est le cas aux synapses entre fibres mossues et cellules pyramidales CA3 de l'hippocampe qui sont les synapses où la neurotransmission liée à ces canaux est la plus étudiée. On trouve alors des hétérotétramères formés de GluK2 et GluK5 au niveau post-synaptique, mais également des récepteurs kainate pré-synaptiques formés de GluK1 et GluK3. Les canaux pré-synaptiques fonctionnent comme des autorécepteurs qui sont activés par le glutamate libéré par le bouton synaptique sur lequel ils sont situés, permettant de le dépolariser de façon plus intense et donc de faciliter la libération d'autres vésicules (Frerking et al. 2001) tandis que les canaux post-

synaptiques permettent un décalage temporel du potentiel post-synaptique excitateur plus lent et interviennent dans les phénomènes de plasticité (Kwon and Castillo 2008, Sachidhanandam et al. 2009, Lerma and Marques 2013). Un autre exemple de rôle des récepteurs kainate est la genèse de rythmes neuronaux, notamment au niveau d'interneurones inhibiteurs (Fisahn et al. 2004, Goldin et al. 2007). Enfin, ces récepteurs sont les récepteurs-canaux du glutamate pour lesquels une signalisation métabotrope est la mieux établie, avec un rôle dans le contrôle de la libération de neurotransmetteur et de l'excitabilité cellulaire (Valbuena and Lerma 2016, Petrovic et al. 2017).

### **1.2.3. Les récepteurs NMDA**

#### ***1.2.3.1. Diversité des récepteurs NMDA***

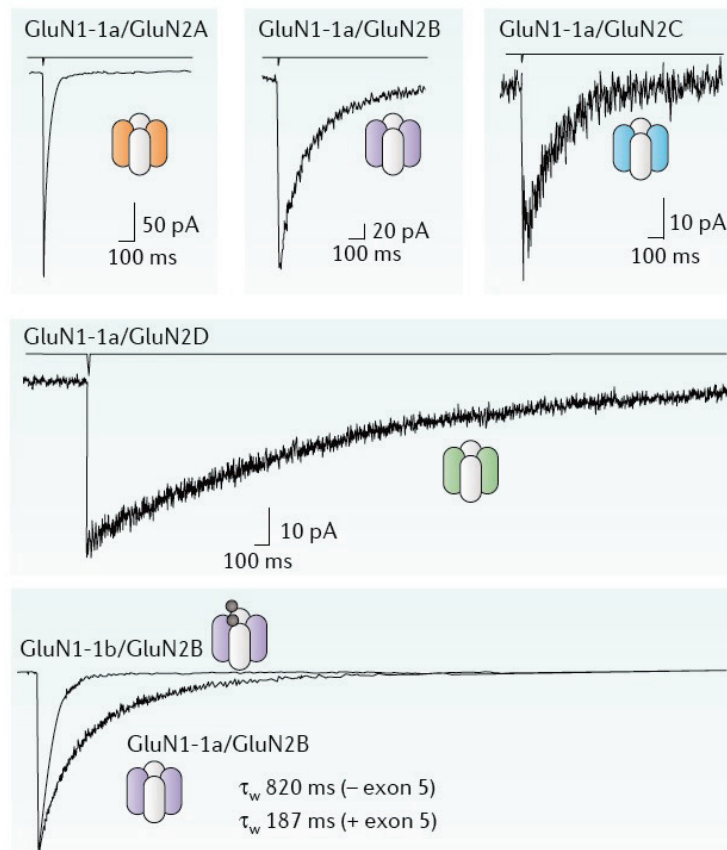
Les gènes de récepteurs NMDA sont au nombre de 7, et sont divisés en trois groupes (Figure 1.2-1). Tout d'abord la sous-unité GluN1, dont il n'existe qu'un seul gène mais, celui-ci étant soumis à de l'épissage alternatif, il en résulte 8 isoformes distincts nommés GluN1-1a à GluN1-4a et GluN1-1b à GluN1-4b (Dingledine et al. 1999). L'isoforme « b » contient un segment extracellulaire de 21 acides aminés appelé cassette N1 et encodé par l'exon 5 qui affecte les propriétés fonctionnelles du récepteur de façon significative (Traynelis et al. 1995, Regan et al. 2018). La famille GluN2 possède 4 gènes, GluN2A à GluN2D et la famille GluN3 deux gènes (GluN3A et GluN3B). Les gènes de récepteurs NMDA sont les plus longs parmi les gènes de récepteurs-canaux du glutamate, notamment à cause de queues carboxy-terminales intracellulaires beaucoup plus longues. Les récepteurs NMDA sont des hétérotétramères obligatoires, associant généralement deux sous-unités GluN1 à deux autres sous-unités (GluN2 et GluN3). Ainsi, les récepteurs NMDA peuvent être des dihétéromères, par exemple un récepteur GluN1/GluN2A, ou des trihétéromères comme GluN1/GluN2A/GluN2B. La diversité moléculaire des récepteurs NMDA se traduit par une diversité fonctionnelle dont un exemple est donné Figure 1.2-2 et qui sera abordée plus loin.



**Figure 1.2-1 : Les 7 gènes codant pour des sous-unités de récepteur NMDA.** La diversité combinatoire est accentuée par l'existence de différents isoformes de GluN1 et de GluN3A. M1, M2, M3 et M4 indiquent les hélices transmembranaires, voir Figure 1.3-1 pour la topologie du récepteur NMDA (Paoletti et al. 2013).

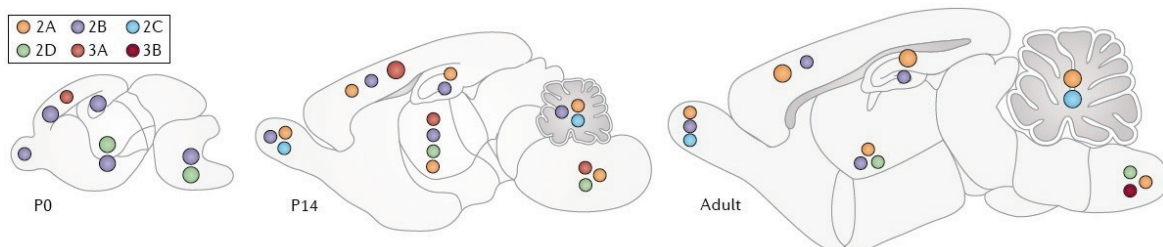
### 1.2.3.2. Distribution des sous-unités dans le cerveau et dans le temps

Les récepteurs NMDA, et donc la sous-unité obligatoire GluN1, sont exprimés de façon ubiquitaires dans le système nerveux central à tous les stades de développement. Ils colocalisent avec les récepteurs AMPA à toutes les synapses glutamatergiques. On remarque cependant d'importantes variations spatiales et temporelles d'expression des différentes combinaisons de récepteurs. Chez le rat adulte par exemple, les sous-unités GluN1-1 et GluN1-4 ont des patrons d'expression complémentaires, la première étant plutôt exprimée dans les structures rostrales comme le cortex et l'hippocampe tandis que la seconde est plutôt exprimée dans les structures caudales comme le thalamus et le cervelet (Figure 1.2-4). L'isoforme GluN1-3 est minoritaire. Le variant 'a' de GluN1 est en général exprimé plus abondamment que l'isoforme 'b', comme c'est le cas dans le cerveau antérieur, mais des exceptions existent comme le cervelet. Au niveau de l'hippocampe, GluN1-1a est majoritaire dans les cellules principales et GluN1-b est exprimé uniquement au niveau de la couche CA3 (Paoletti 2011, Paoletti et al. 2013).



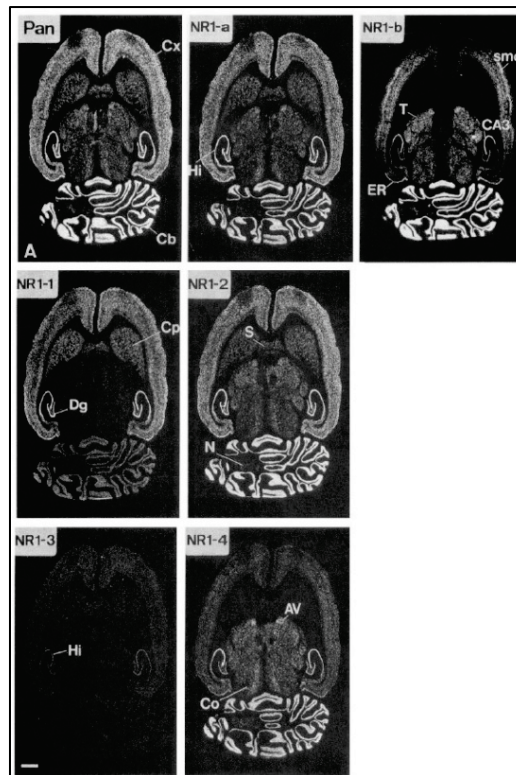
**Figure 1.2-2 : Les propriétés du récepteur NMDA sont déterminées par sa composition en sous-unités.**

Illustration de l’influence de la composition en sous-unités sur les propriétés du récepteur NMDA avec l’exemple de la cinétique de désactivation du glutamate : on enregistre sur des cellules en culture des courants de récepteurs NMDA provoqués par une brève application (< 5 ms) saturante (1 mM) de glutamate. Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A se désactivent beaucoup plus vite que les autres sous-types. La présence de la cassette extracellulaire N1 (variant d’épissage GluN1-1b) accélère la cinétique de désactivation (Paoletti et al. 2013).



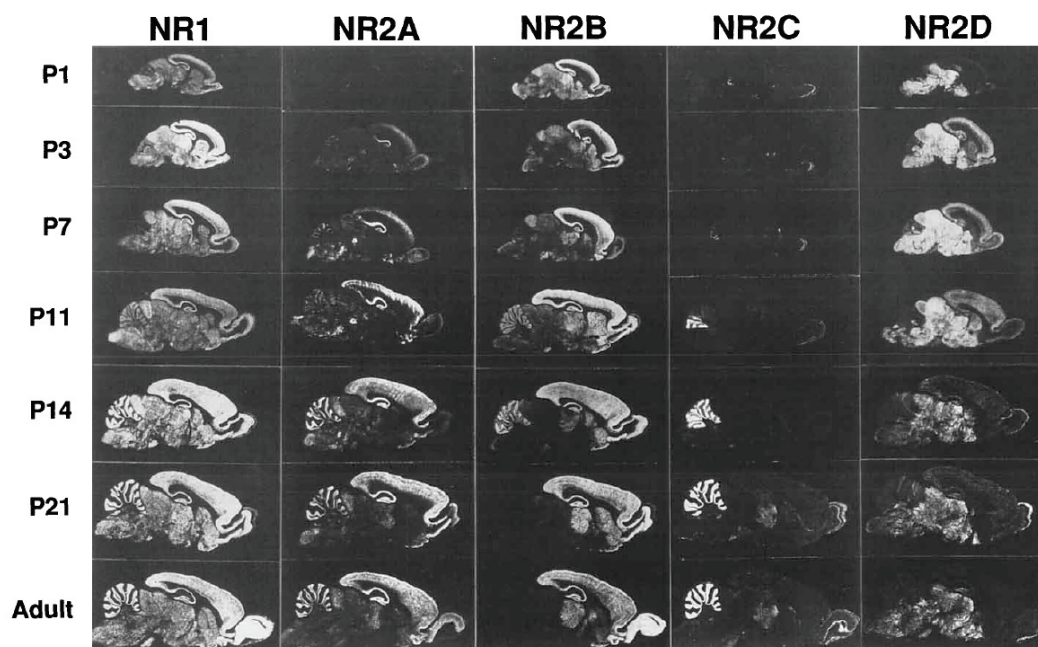
**Figure 1.2-3 : Distribution schématique des sous-unités GluN2 et GluN3 chez la souris à différents stades de développement.**

Lorsque différentes sous-unités sont exprimées dans la même région au même moment, les récepteurs NMDA peuvent être non seulement dihétramériques mais également trihétramériques (Paoletti et al. 2013).



**Figure 1.2-4 : Distribution des différents isoformes de GluN1 dans le cerveau de rat adulte révélée par hybridation in situ.**

Les coupes sont horizontales, la barre d'échelle en bas à gauche mesure 1.8 mm (Laurie and Seeburg 1994).



**Figure 1.2-5 : Distribution des sous-unités de récepteurs NMDA dans le cerveau de rat au cours du développement révélée par hybridation in situ.** La coupe est sagittale, la barre d'échelle mesure 10 mm (Akazawa et al. 1994).

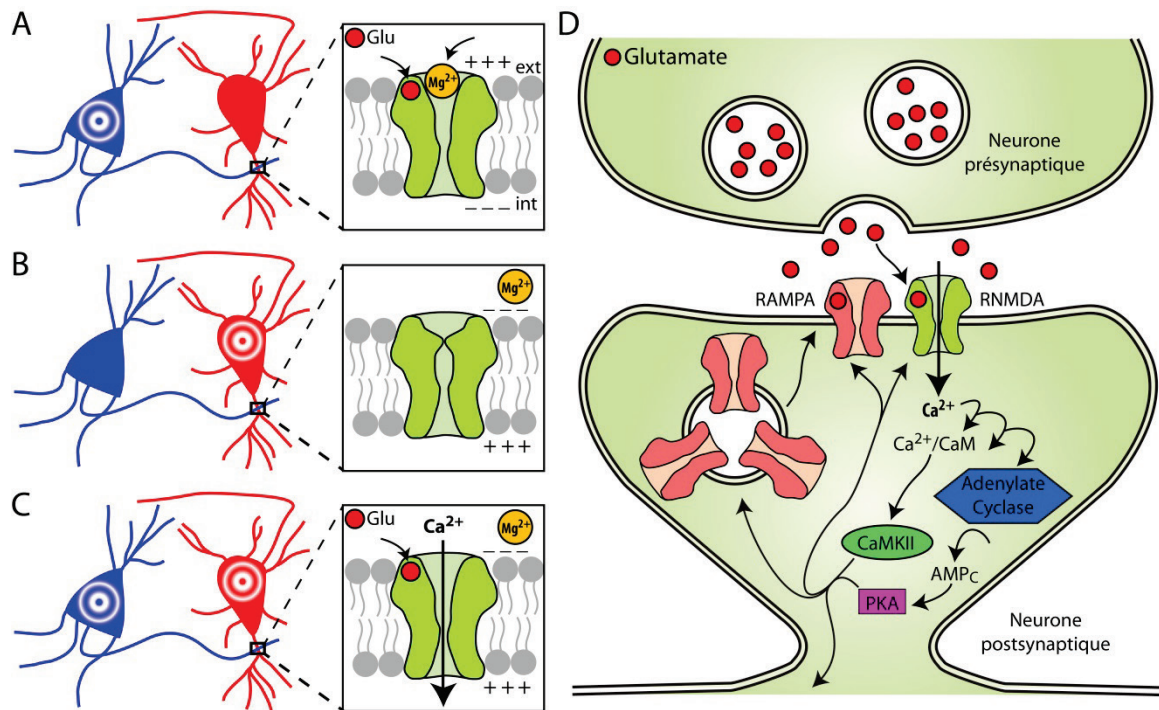
La sous-unité GluN2 a un patron d'expression très variable en fonction des gènes et qui change également énormément au cours du temps (Figure 1.2-3 et Figure 1.2-5). Durant la vie embryonnaire, seules les sous-unités GluN2B et GluN2D sont exprimées, avec une distribution réduite de GluN2D. Dans les deux premières semaines qui suivent la naissance, la sous-unité GluN2A est de plus en plus exprimée et finit par être ubiquitaire, tandis que l'expression de la sous-unité GluN2B cesse au niveau postérieur (cervelet par exemple). La sous-unité GluN2C est exprimée tardivement, principalement au niveau du cervelet et du bulbe olfactif. Les changements de sous-unités GluN2 au sein des récepteurs NMDA se manifestent fonctionnellement par des changements cinétiques au niveau des courants synaptiques. Le rôle des sous-unités GluN3, dont l'expression est contenue à certaines régions et certaines périodes spécifiques, est moins bien compris (Akazawa et al. 1994, Paoletti et al. 2013, Perez-Otano et al. 2016).

Ces variations régionales et temporelles d'expressions sont complexifiées par un contrôle précis de la combinatoire de sous-unités effectivement présentes à la densité post-synaptique. Ainsi, il a été montré que la composition des récepteurs NMDA à une synapse peut changer très rapidement de façon bidirectionnelle en fonction de l'activité (Bellone and Nicoll 2007).

### ***1.2.3.3. Rôle dans la plasticité synaptique***

On appelle plasticité synaptique la capacité des synapses à se renforcer ou à s'affaiblir au cours du temps. Un affaiblissement de la synapse se traduit par une perte d'efficacité de la transmission synaptique, c'est-à-dire une diminution de la capacité des potentiels d'action pré-synaptiques à déclencher potentiels post-synaptiques excitateurs, tandis qu'un renforcement correspond à une augmentation de cette efficacité. Lorsque ces changements sont durables, on parle alors respectivement de dépression à long terme (LTD) et de potentiation à long terme (LTP). La plasticité synaptique est vue comme le mécanisme moléculaire qui sous-tend des capacités cognitives telles que l'apprentissage ou la mémoire (Collingridge 1987). Les récepteurs NMDA, qui sont des canaux cationiques comme les autres iGluRs, sont des médiateurs essentiels de nombreuses formes de plasticité synaptique du fait de leur perméabilité calcique. La perméabilité aux ions  $\text{Ca}^{2+}$  des récepteurs NMDA est variable selon les sous-unités qui composent le

récepteur, mais elle est toujours forte : entre deux et 8 fois plus importante que celle des récepteurs AMPA ou kainate lorsqu'ils sont perméables au calcium, c'est-à-dire lorsqu'ils ne contiennent pas de sous-unité éditée au niveau du site Q/R (Wollmuth 2018).



**Figure 1.2-6 : Le récepteur NMDA, détecteur de coïncidence impliqué dans la plasticité synaptique.**

**A** Une activation du neurone présynaptique déclenche la libération de glutamate qui en se fixant sur les récepteurs NMDA, conduit à l'ouverture de leur canal. Cependant, les ions  $Mg^{2+}$  du milieu extracellulaire bloquent le passage des ions en raison de leur forte affinité pour le pore quand la membrane est hyperpolarisée. **B** L'activation du neurone post-synaptique se traduit par une dépolarisation de la membrane qui empêche le blocage du pore par le magnésium mais en l'absence de glutamate le canal reste fermé. **C** L'activation simultanée des neurones pré et post-synaptiques conduit à la fois à l'ouverture du canal et à une interruption du blocage magnésium. Le récepteur NMDA étant perméable au calcium permet alors une entrée d'ions  $Ca^{2+}$  dans la cellule. On parle de détection de coïncidence. **D** L'entrée de calcium dans la cellule déclenche des cascades de signalisation intracellulaires contrôlant la plasticité synaptique. Les effets peuvent être par exemple une phosphorylation des récepteurs synaptiques, l'ajout de nouveaux récepteurs AMPA à la synapse (potentiation dépendante des récepteurs AMPA) ou encore une modification de l'expression des gènes.



Les récepteurs NMDA colocalisent avec les récepteurs AMPA au niveau post-synaptique de toutes les synapses glutamatergiques. Ils sont activés lors de la libération pré-synaptique de glutamate à condition que le neurone post-synaptique soit dépolarisé (Figure 1.2-6). En effet, le pore des récepteurs NMDA est bloqué avec une forte dépendance au potentiel de membrane par les ions  $Mg^{2+}$  présents dans le milieu extracellulaire ce qui empêche le passage du courant tant que la membrane est polarisée. Ce phénomène de blocage du pore fait des récepteurs NMDA des « détecteurs de coïncidence » : leur activation a lieu quand une activation pré-synaptique (libération de glutamate) et une activation post-synaptique (dépolarisation de la membrane post-synaptique qui lève le blocage magnésium) sont concomitantes.

L'activation des récepteurs NMDA conduit à une entrée de calcium dans la cellule, permettant de déclencher les cascades intracellulaires contrôlant la plasticité (Kalev-Zylinska et al. 2009, Wang et al. 2009). Ce phénomène est qualifié d'induction de plasticité dépendante des récepteurs NMDA. Les effets en aval (LTP ou LTD) dépendent de la quantité de calcium impliquée et du décalage temporel de son entrée. Ces deux paramètres sont en partie déterminés par le sous-type de récepteur NMDA présent à la synapse. Au niveau des synapses glutamatergiques CA1 de l'hippocampe qui sont parmi les plus étudiées, le principal mécanisme de plasticité est une modification du nombre de récepteurs AMPA présents en face du site de libération du glutamate. On parle alors de LTP et LTD dont l'expression dépend des récepteurs AMPA (Berberich et al. 2007). Des mécanismes de plasticité dont l'expression dépend directement des récepteurs NMDA existent également, notamment aux synapses des fibres moussues des cellules en grain de l'hippocampe (Rebola et al. 2011, Hunt et al. 2013, Rebola et al. 2017).

En plus de leur rôle post-synaptique classique, les récepteurs NMDA sont aussi exprimés au niveau pré-synaptique à de nombreuses synapses du système nerveux central où ils facilitent la libération synaptique et modulent les mécanismes contrôlant la maturation synaptique et la plasticité au cours du développement cérébral (Berberich et al. 2007, Bouvier et al. 2015, Banerjee et al. 2016). Ils peuvent être activés par des fibres afférentes mais également par des astrocytes voisins (Jourdain et al. 2007, Bidoret et al. 2009). Par ailleurs les récepteurs NMDA sont aussi exprimés au niveau extra-synaptique où leur fonction est encore débattue. Un rôle dans les relations avec l'environnement

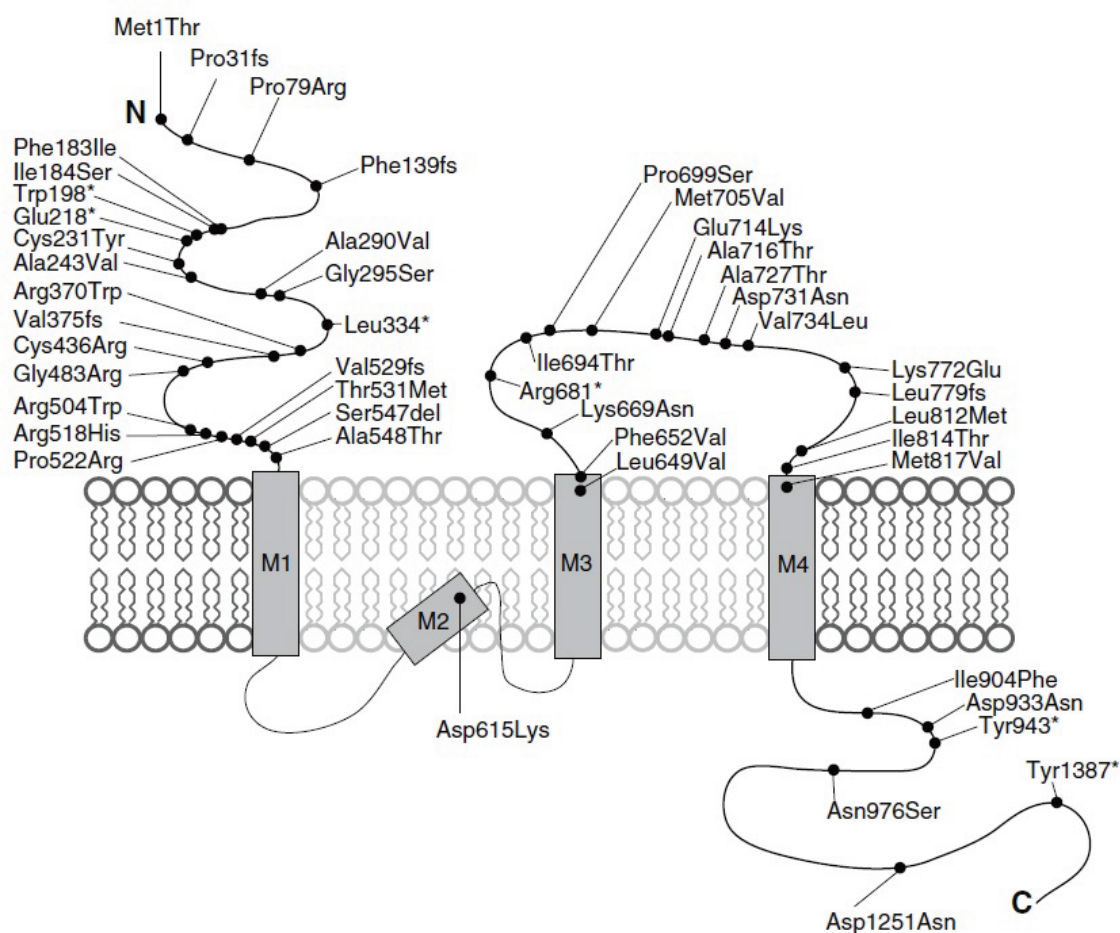
glial et dans la plasticité synaptique ont été proposés (Papouin and Oliet 2014, Yang et al. 2017). Leur implication comme promoteurs de la mort cellulaire est également très controversée (Hardingham and Bading 2010). Enfin, les récepteurs NMDA auraient également une action de signalisation de type métabotrope, c'est-à-dire qui passe par un changement conformationnel en l'absence de courant ionique (Dore et al. 2015, Dore et al. 2017). Cette propriété, qui met en jeu un mouvement de la partie intracellulaire du récepteur lors de la liaison de l'agoniste côté extracellulaire, est encore mal comprise et serait impliquée dans la LTD.

#### ***1.2.3.4. Implication dans les pathologies du système nerveux***

Du fait de leur caractère ubiquitaire et de leur importance primordiale dans la plasticité synaptique, les récepteurs NMDA sont impliqués dans de nombreuses pathologies (Paoletti et al. 2013). Leurs dysfonctionnements, qui peuvent provenir de problèmes d'expression, d'adressage, de localisation, ou d'activité du récepteur (Lau and Zukin 2007, Endeley et al. 2010, Serraz et al. 2016) conduisent en effet à des défauts synaptiques généralement nocifs. Nous nous limiterons ici à quelques exemples, d'abord pour l'hyper-activation du récepteur, ensuite pour son hypo-activation.

Lors d'un AVC ou d'un trauma crânien, les neurones ischémiques, privés d'oxygène et de glucose, ne peuvent plus maintenir leur potentiel membranaire et se dépolarisent. Cette dépolarisation conduit à une libération aberrante de glutamate, activant les récepteurs-canaux. L'hyperactivité du récepteur NMDA est alors directement délétère car une entrée de calcium trop importante dans la cellule déclenche la mort neuronale : on parle d'excitotoxicité (Lai et al. 2011, Yuan et al. 2015). Les maladies neurodégénératives comme la maladie d'Huntington, la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson peuvent également conduire de façon chronique à des niveaux de glutamate élevés. Dans la maladie d'Alzheimer, l'antagoniste des récepteurs NMDA mémantine est utilisé pour traiter les patients à des stades modérés à sévères de la maladie mais son efficacité comparée à d'autres molécules analogues n'est pas bien expliquée (Parsons et al. 2007, Johnson et al. 2015). Dans la maladie de Parkinson, la dégénération des neurones dopaminergiques de la *substantia nigra* aboutit à une suractivation des projections

glutamatergiques vers le striatum (Hallett et al. 2005). De plus, la dyskinésie provoquée par les stimulations cérébrales profondes ou par les traitements à base de L-DOPA est liée à une dérégulation de la transmission glutamatergique. Des molécules ciblant les récepteurs NMDA pourraient donc avoir un intérêt thérapeutique dans le traitement de cette maladie (Sgambato-Faure and Cenci 2012). Les récepteurs NMDA sont également impliqués dans des pathologies associées à une suractivité des voies excitatrices sans pour autant qu'il y ait nécessairement excitotoxicité, par exemple dans des douleurs neuropathiques ou dans le cas de l'épilepsie.



**Figure 1.2-7 : Mutations de la sous-unité GluN2A chez des patients présentant des troubles neuro-développementaux.**

Position sur la sous-unité GluN2A et numéro d'acide aminé de mutations de décalage du cadre de lecture, sur site d'épissage, non-sens et faux sens (Burnashev and Szepetowski 2015). La topologie détaillée d'une sous-unité de récepteur-canal du glutamate est présentée plus loin (Figure 1.3-1).

L'hypofonction des récepteurs NMDA a également des conséquences néfastes. Il a par exemple été proposé que le déclin cognitif qui accompagne le vieillissement est lié à la vulnérabilité particulière des récepteurs NMDA, conduisant à une plasticité synaptique défailante (Magnusson et al. 2010). Des déficits d'expression en GluN2B corrélés avec des défauts d'apprentissage et de LTP ont été identifiés chez des rats âgés (Clayton et al. 2002). La schizophrénie est classiquement attribuée à un excès de dopamine malgré le fait que cette hypothèse n'explique pas certains symptômes tels que le retrait social, la perte de motivation et une émotivité réduite. Une signalisation glutamatergique altérée pourrait être une meilleure piste pour la genèse de la schizophrénie (Moghaddam and Javitt 2012). Ainsi, certains antagonistes de récepteurs NMDA comme la kétamine (voir 1.4.8) induisent chez l'homme des symptômes semblables à ceux observés chez des patients schizophrènes (Paoletti et al. 2013). Des expériences comportementales chez des souris présentant une expression amoindrie des récepteurs NMDA soutiennent aussi cette piste (Mohn et al. 1999). De plus, ces résultats ont été confirmés lorsque le déficit d'expression est restreint à une sous-population spécifique d'interneurones GABAergiques cortico-limbiques (Belforte et al. 2010). Le mécanisme avancé est une diminution de l'activité des récepteurs NMDA aux synapses des interneurones GABAergiques inhibiteurs, conduisant à un déséquilibre entre excitation et inhibition. Ce déséquilibre se traduirait par des altérations persistantes des circuits neuronaux conduisant à des psychoses et à des altérations des fonctions cognitives et exécutives.

Ces dernières années, des études génétiques chez l'homme ont mis en évidence la présence de mutations des gènes du récepteur NMDA chez certains patients atteints de problèmes neuro-développementaux comme les troubles du spectre autistique, le retard mental ou l'épilepsie infantile (Figure 1.2-7). Parvenir à relier la mutation à son effet fonctionnel pourrait conduire à de nouvelles pistes de thérapies ciblées (Lemke et al. 2013, Burnashev and Szepetowski 2015, Serraz et al. 2016).

Les exemples de pathologies explicités ici ne donnent pas une image exhaustive de l'implication des récepteurs NMDA dans des maladies mais donnent un aperçu de la variété des troubles où ils peuvent être impliqués (Paoletti et al. 2013). Cette implication fait d'eux des cibles thérapeutiques et le développement d'antagonistes ou d'agonistes les ciblant a un intérêt potentiel. Une première génération d'antagonistes a vu le jour

dans les années 80, principalement des bloqueurs du canal ionique (molécule qui bouche le pore et empêche le passage des ions) et des antagonistes compétitifs (molécule qui entre en compétition avec l'agoniste au niveau de son site de fixation, sans déclencher l'activation du récepteur). Ces molécules ont échoué en phase clinique à cause de leur manque d'efficacité et d'effets secondaires intolérables (Muir 2006). On explique les effets secondaires majeurs de ces traitements par leur manque de sélectivité. Ils agissent en effet sur tous les récepteurs NMDA indistinctement, alors que ces derniers ne sont dysrégulés que dans certaines populations de neurones ou certains circuits. Seule la mémantine, mieux tolérée, a obtenu une autorisation de mise sur le marché pour la maladie d'Alzheimer (Wilkinson 2012, Pierson et al. 2014). Suite à ces échecs, les tentatives ont donc porté sur un meilleur ciblage des récepteurs NMDA. Un des moyens de sélectionner les récepteurs impactés, est l'utilisation de molécules dont la pharmacologie est spécifique de certains sous-types de récepteur NMDA en fonction de leur composition en sous-unité. Les modulateurs allostériques sont de bons candidats pour de telles propriétés pharmacologiques (voir partie 1.4). Une nouvelle génération de molécules ciblant sélectivement la sous-unité GluN2B a donc été développée dans les années 1990, les « prodils », dont la plus répandue est l'ifenprodil, mais aucune n'est actuellement sur le marché.

**Contribution of NMDAR subunit alterations to neurological and psychiatric disorders**

<b>Disease indications</b>	<b>Key NMDAR-subunit related alterations</b>	<b>Therapeutic treatments</b>
Cerebral ischaemia and traumatic brain injury	Excessive activation of NMDA receptors (NMDARs), especially extrasynaptic GluN2B-containing receptors, owing to increased extracellular glutamate levels. Hyperactivation of NMDARs leads to neuronal death	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GluN2B-selective antagonists</li> <li>• Peptides disrupting GluN2B-interacting partners</li> </ul>
Pain	GluN2B-containing receptors are majorly implicated, and alterations include overexpression and altered phosphorylation state of GluN2B. GluN2A-containing receptors can also be involved	GluN2B-selective antagonists
Alzheimer's disease	Activation of GluN2B-containing NMDARs mediates amyloid- $\beta$ (A $\beta$ )-induced alterations in synaptic plasticity and synapse loss, enhanced production of A $\beta$ - and tau-induced excitotoxicity	NMDAR antagonist (memantine) or GluN2B-selective antagonists
Huntington's disease	Activation of extrasynaptic GluN2B-containing NMDARs increases mutant huntingtin protein-induced excitotoxicity	NMDAR antagonists or GluN2B-selective antagonists
Parkinson's disease (dyskinesia)	Enhanced synaptic GluN2A expression and redistribution of GluN2B-containing receptors from synaptic to extrasynaptic locations	<ul style="list-style-type: none"> <li>• GluN2B-selective antagonists</li> <li>• Potential interest for interventions targeting GluN2A subunits</li> </ul>
Depression	Inhibitors of NMDARs, in particular GluN2B-containing receptors, induce rapid (hours) and sustained (days) reduction in depressive symptoms	NMDAR antagonists (ketamine) or GluN2B-selective antagonists
White matter injury	NMDAR activation leads to oligodendrocyte damage and loss of the myelin sheath. Specific involvement of GluN2C and/or GluN3A subunits	Potential interest for GluN2C- or GluN3A-selective antagonists
Autism spectrum disorders	Either reduced or enhanced NMDAR function is implicated. Mechanisms are unclear and there is no clear subunit specificity	Potential interest for NMDAR antagonists or NMDAR potentiators
Cognitive impairments	Reduced expression of NMDARs, especially GluN2B-containing receptors, correlates with decline in cognitive functions	Potential interest for NMDAR potentiators
Schizophrenia	Reduced NMDAR presence and/or activity, probably in GABAergic inhibitory neurons, which leads to an imbalance in neural network activity. Suggestions for a preferential loss of GluN2A-containing receptors	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NMDAR potentiators</li> <li>• D-serine, glycine and glycine transporter 1 inhibitors</li> <li>• Potential interest for GluN2A-selective potentiators</li> </ul>
Anti-NMDAR encephalitis	Anti-NMDAR antibodies lead to reduced NMDAR density and impaired synaptic plasticity. Specific dispersal of GluN2A subunits from synaptic sites	Potential interest for NMDAR potentiators

**Table 2 : Exemples de pathologies impliquant des récepteurs NMDA, en lien avec les sous-unités potentiellement impliquées et les traitements associés (Paoletti et al. 2013).**

L'intérêt pour les récepteurs NMDA n'est pas éteint aujourd'hui. La Table 2 illustre les pathologies dans lesquelles le récepteur NMDA est impliqué, en mettant l'accent sur les sous-unités à l'origine du dysfonctionnement. Une identification plus poussée de la composition des récepteurs NMDA mis en jeu dans les dysfonctionnements soulève l'espoir de trouver des molécules spécifiques de ces sous-types, qui permettent un traitement ciblé évitant des effets secondaires massifs (Paoletti et al. 2013). Un antagoniste des récepteurs NMDA testé pour traiter la dépression, la kétamine, semble par exemple être efficace dans un premier temps avant de provoquer des effets secondaires ressemblant à la schizophrénie. Il faudrait donc parvenir à dissocier les deux effets par une plus grande spécificité d'action (Johnson et al. 2015). Par ailleurs, les mutations identifiées ces dernières années dans les gènes des récepteurs NMDA ont suscité un intérêt nouveau pour ce dernier car ce sont autant de nouvelles pistes à suivre pour comprendre les maladies associées et imaginer de nouveaux traitements (Burnashev and Szepietowski 2015).

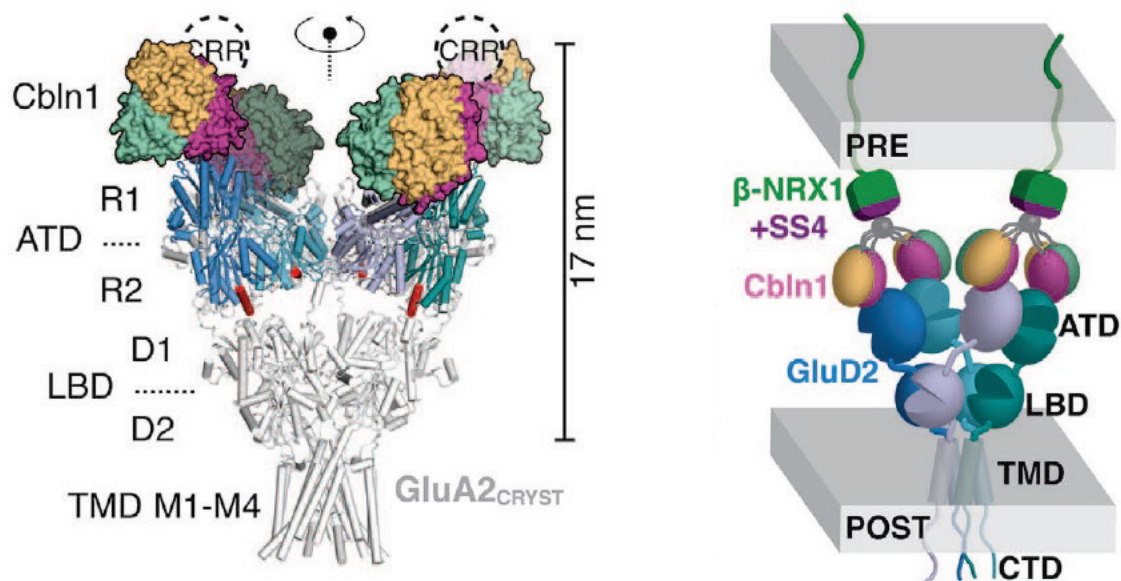
#### **1.2.4. Les récepteurs orphelins GluD1 et GluD2**

Deux autres sous-unités de récepteurs-canaux du glutamate, delta-1 et delta-2, codées par les gènes GluD1 et GluD2, ont été identifiées par homologie de séquence avec les autres iGluRs (Yamazaki et al. 1992, Lomeli et al. 1993). Aucun ligand connu ne les active et elles sont donc dénommées orphelines (Schmid and Hollmann 2008). Cependant, il a été montré que leur domaine de liaison de l'agoniste lie la glycine et la D-sérine tout comme celui de la sous-unité NMDA obligatoire GluN1 (Naur et al. 2007). De plus, une mutation dénommée 'Lurcher' correspondant à la substitution d'une alanine en thréonine au niveau d'un motif conservé de la région transmembranaire permet de les étudier en établissant un fort courant constitutif aux propriétés de perméation semblables à celles des autres iGluRs (Kohda et al. 2000). Ces récepteurs semblent donc capables de fonctionner en tant que canaux ioniques dans certaines conditions.

En dehors d'une éventuelle action ionotropique, les récepteurs delta sont impliqués dans la synaptogénèse (Uemura and Mishina 2008, Yasumura et al. 2012) notamment grâce à des contacts transynaptiques avec la Cerebellin 1 (Cbln1) (Matsuda et al. 2010,

Uemura et al. 2010). En effet, la grande taille des récepteurs canaux du glutamate, qui protrudent de près de 15 nm dans la fente synaptique (Sobolevsky et al. 2009) en fait des partenaires idéaux pour une interaction directe avec les protéines du bouton présynaptique, la plupart des synapses ayant une taille comprise entre 15 et 25 nm (Savtchenko and Rusakov 2007). Les bases structurales de l'interaction entre GluD2 et Cbln1 ont récemment été résolues (Figure 1.2-8) et un modèle de son rôle dans la synaptogénèse a été proposé (Elegheert et al. 2016).

La sous-unité GluD2 est notamment présente dans le cervelet et sa suppression chez la souris aboutit à de l'ataxie et une organisation synaptique cérébelleuse altérée (Kashiwabuchi et al. 1995, Ichikawa et al. 2002).



**Figure 1.2-8 : Interaction entre le domaine N-terminal de GluD2 et Cbln1.**

À gauche, structure de l'interaction entre le domaine N-terminal de GluD2 en bleu et cyan et Cerebellin 1 en représentation « surface ». Le domaine N-terminal de GluD2 est aligné avec le domaine correspondant d'un récepteur AMPA (fond grisé) afin de donner une idée de la taille du récepteur entier. À droite, schéma replaçant l'interaction entre les deux protéines dans le contexte de la fente synaptique. GluD2 est enchâssé dans la membrane post-synaptique par son domaine transmembranaire tandis que Cbln1 est ancré à la membrane pré-synaptique via une interaction avec la  $\beta$ -neurexin1 (Elegheert et al. 2016).



## 1.3. Structure des récepteurs ionotropiques du glutamate

### 1.3.1. Architecture globale

Les récepteurs-canaux du glutamate sont des tétramères massifs constitués de 4 sous-unités de plus de 900 acides-aminés chacune. Ce sont des protéines transmembranaires, dont la partie membranaire est traversée d'un canal central à ouverture contrôlée. Chaque sous-unité présente une organisation modulaire de 4 domaines : un domaine N-terminal (NTD pour 'N-terminal domain'), un domaine de liaison de l'agoniste (ABD pour 'agonist-binding domain'), un domaine transmembranaire (TMD pour 'transmembrane domain') et un domaine carboxy-terminal intracellulaire (ou CTD pour 'carboxy-terminal domain'). Mis à part le CTD et l'hélice transmembranaire M4, chacun de ces domaines est homologue à des protéines bactériennes de structure connue (O'Hara et al. 1993, Wo and Oswald 1995, Wood et al. 1995, Paas 1998, Chen et al. 1999a, Kuner et al. 2003).

La première structure complète d'un récepteur ionotropique du glutamate est parue en 2009, révélant l'architecture du récepteur AMPA homotétramérique GluA2 (Sobolevsky et al. 2009). Plus récemment, d'autres structures d'iGluRs entiers obtenues par cristallographie ou par cryo-microscopie électronique sont parues incluant des membres de chacune des trois sous-familles :

- Pour les récepteurs AMPA, des structures de récepteurs homomériques GluA2 dans différents états (Chen et al. 2014, Durr et al. 2014, Meyerson et al. 2014, Yelshanskaya et al. 2014) ainsi qu'une structure de récepteur hétéromérique GluA2/3 (Herguedas et al. 2016), mais également des structures présentant les

interactions avec des protéines auxiliaires (Twomey et al. 2016, Twomey et al. 2017b), dont une structure représentant l'état actif (i.e. canal ionique ouvert ; Twomey et al. 2017a).

- Pour les récepteurs kainates, des structures de récepteurs homomériques GluK2 (Meyerson et al. 2014, Meyerson et al. 2016).
- Pour les récepteurs NMDA qui sont obligatoirement hétéromériques, des structures de dihétéromères GluN1/GluN2B (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014, Tajima et al. 2016, Zhu et al. 2016, Regan et al. 2018) et de trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B (Lu et al. 2017).

Les récepteurs ionotropiques du glutamate possèdent une symétrie globale qui contrairement aux autres récepteurs-canaux, ne correspond pas au nombre de sous-unités qui les composent car elle est d'ordre 2 pour 4 sous-unités. L'architecture générale de la protéine est stratifiée, avec des couches « horizontales » de domaines : une couche de 4 domaines NTDs au niveau distal par rapport à la membrane plasmique, puis une couche de 4 domaines ABDs puis le domaine transmembranaire et enfin les domaines CTDs intracellulaires (Figure 1.3-1).

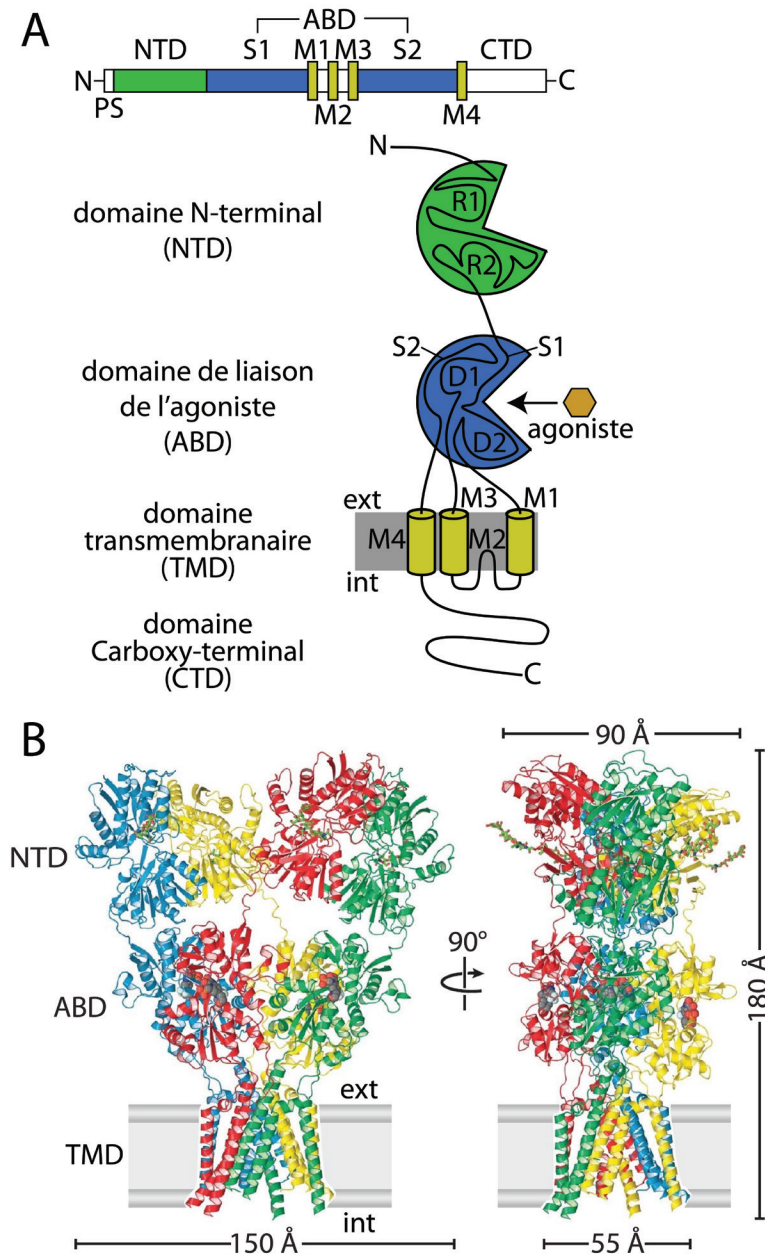
Les domaines extracellulaires, NTDs et ABDs sont organisés en dimères de dimères, alors que le domaine transmembranaire présente une symétrie d'ordre 4 avec le pore en son centre (la symétrie d'ordre 4 n'est cependant pas parfaite pour les récepteurs NMDA ; Song et al. 2018). Il en découle une rupture de symétrie entre le domaine transmembranaire et la partie extracellulaire du récepteur, permettant de passer de la symétrie d'ordre 4 à la symétrie d'ordre 2. De ce fait, même au sein d'un homotétramère où toutes les sous-unités ont la même séquence peptidique, il y a 2 conformations possibles pour une sous-unité, appelées « A/C » et « B/D » sur la base d'une dénomination A/B/C/D des 4 sous-unités (Figure 1.3-2 ; Sobolevsky et al. 2009).

Au sein de la couche de domaines NTD, le NTD « A » forme un dimère avec le NTD « B » grâce à une large surface de contact, tandis que le NTD « C » forme un dimère avec le NTD « D ». Ces deux dimères interagissent entre eux via une faible surface de contact entre les sous-unités « B » et « D » qui sont proximales par rapport à l'axe de symétrie global à ce niveau. Au sein de la couche de domaines ABD, la sous-unité « A » n'a pas le

même partenaire de dimérisation, elle forme un dimère avec l'ABD « D », tandis que les sous-unités « B » et « C » forment l'autre dimère. Ces deux dimères interagissent entre eux via les sous-unités « A » et « C » qui sont proximales par rapport à l'axe de symétrie à ce niveau. Cette organisation particulière, avec un changement de partenaire direct de dimérisation et un changement entre position proximale et distale lorsque l'on passe de la couche NTD à la couche ABD est appelée 'subunit crossover' ou 'domain swapping' (Figure 1.3-2).

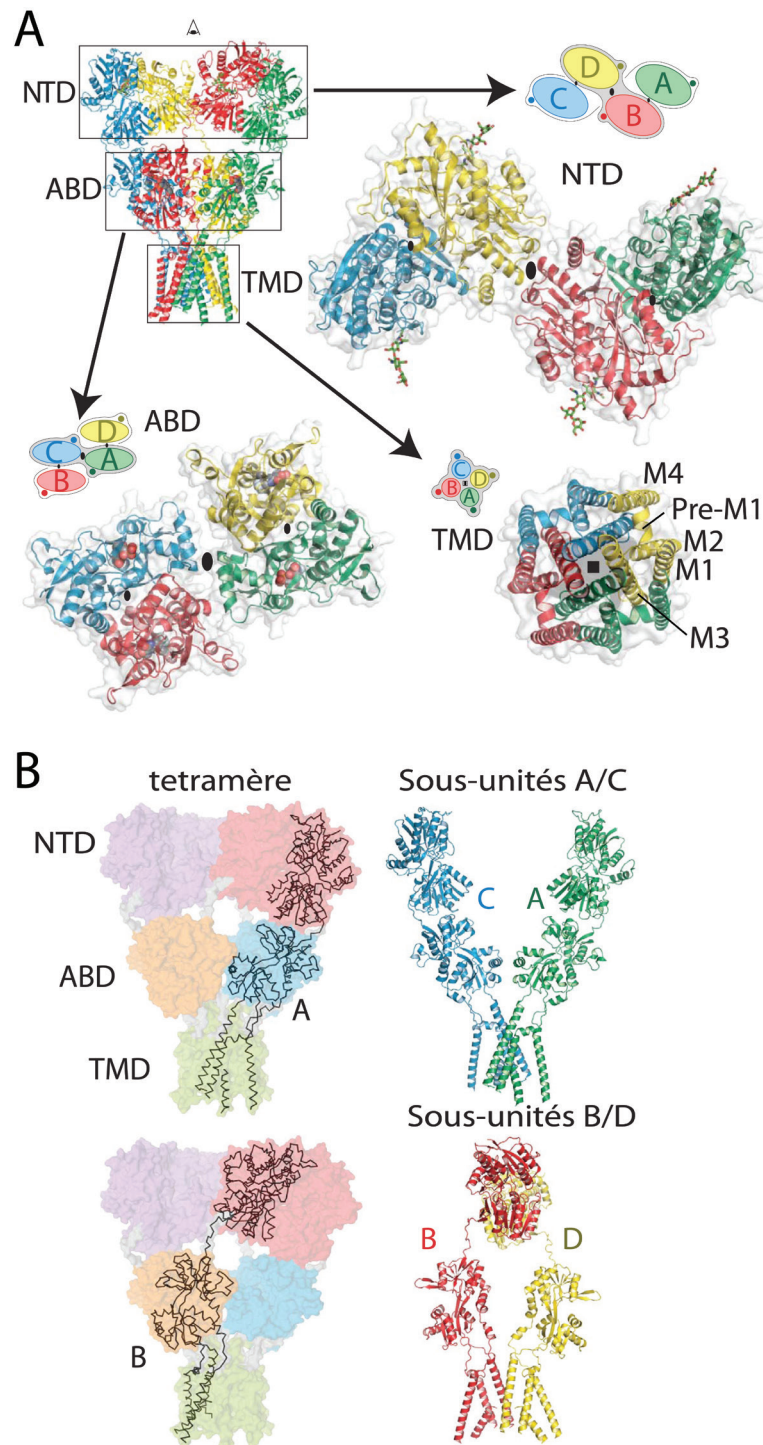
Le fait que même au sein d'un homotétramère, dont toutes les sous-unités partagent la même séquence peptidique, on observe deux conformations était inattendu. Les liens ('linkers') entre domaines ont une grande importance dans cette organisation car ce sont eux qui sont responsables du 'subunit swapping' entre NTDs et ABDs, ainsi que de la rupture de symétrie entre ABDs et TMD. La participation des sous-unités A/C à l'ouverture du canal sera donc différente de celle des sous-unités B/D. Au sein des récepteurs NMDA qui sont des hétérotétramères obligatoires, c'est la sous-unité GluN1 qui occupe la position A/C tandis que les 2 autres sous-unités occupent la position B/D (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014). La première structure hétéromérique de récepteur AMPA composée des sous-unités GluA2 et GluA3 ne met pas en évidence de préférence claire de position entre les sous-unités. La sous-unité GluA2 est en position A/C dans la structure proposée mais dans les cristaux de couches de domaines isolées, la maille cristalline suggère que la situation inverse est également possible, en accord avec des expériences de pontage cystéine (Herguedas et al. 2016).

Certaines des multiples structures parues ces dernières années présentent des réarrangements majeurs dans l'organisation des domaines extracellulaires. Des ruptures d'interfaces inter-dimères ont été avancées tant au niveau des ABDs qu'au niveau des NTDs. Des rotations de domaines aboutissant à des couches ABDs ou NTDs présentant des pseudo-symétries d'ordre 4, ou organisées de façon circulaire ont également été proposées. La validité fonctionnelle de ces différents nouveaux arrangements reste à démontrer mais il pourrait s'agir de représentations d'états désensibilisés du récepteur. Les structures complètes ont également révélé l'existence de différences structurales notables entre récepteurs NMDA et récepteurs AMPA/kainate qui seront abordées plus loin (section 1.4 en particulier Figure 1.4-6).



**Figure 1.3-1 : Topologie et structure des récepteurs ionotropiques du glutamate.**

**A** Représentation linéaire d'une sous-unité et illustration schématique de sa topologie. La structure est modulaire en domaines séparés et reliés par des liens. Le domaine N-terminal est en vert, le domaine de liaison de l'agoniste, formé par les segments S1 et S2 est en bleu. Ces deux domaines extracellulaires sont bilobés ou 'clamshell'. Les lobes sont désignés R1 et R2 pour le NTD et D1 et D2 pour l'ABD. Le domaine transmembranaire en jaune est formé de 3 hélices et d'une boucle réntrante (M2). PS désigne le peptide signal (Figure adaptée de Traynelis et al. 2010). **B** Première structure cristallographique d'un récepteur du glutamate entier obtenue en 2009 (pdb 3KG2). Les 4 sous-unités sont présentées chacune dans une couleur différente (Sobolevsky et al. 2009).



**Figure 1.3-2 : Organisation structurale des récepteurs ionotropiques du glutamate.**

**A** Interfaces entre les différentes sous-unités au sein des couches NTD, ABD et TMD. Les couches sont vues du dessus, dans l'axe de symétrie d'ordre 2. Les NTDs et ABD ont une symétrie d'ordre 2 tandis que le TMD a une symétrie d'ordre 4. **B** La rupture de symétrie qui aboutit à deux conformations possibles (A/C ou B/D) pour des sous-unités de séquences identiques a lieu entre le TMD et l'ABD. On remarque l'échange de partenaire de dimérisation entre l'ABD et le NTD ('subunit swap' ou 'crossover'). (Sobolevsky et al. 2009).

### 1.3.2. Assemblage et trafic intracellulaire

La formation de tétramères à partir des différentes sous-unités se produit au niveau du réticulum endoplasmique (Herguedas et al. 2013). Là, la formation de dimères passe tout d'abord par des interactions entre NTDs avant que la tétramérisation n'ait lieu, vraisemblablement grâce aux interactions entre les ABDs et TMDs (Ayalon and Stern-Bach 2001, Mansour et al. 2001, Ayalon et al. 2005). Les interactions entre NTDs, qui sont suffisantes pour que des domaines isolés artificiellement forment des dimères en solution, sont donc centrales pour l'association et le trafic des récepteurs en permettant l'association initiale des sous-unités, mais il a également été proposé qu'elles soient à l'origine de la sélectivité de l'assemblage et qu'elles contiennent des signaux de rétention empêchant les sous-unités isolées de quitter le réticulum endoplasmique (Ayalon et al. 2005, Qiu et al. 2009). Au niveau du réticulum toujours, il semble que des changements conformationnels associés à un fonctionnement normal du récepteur, comme l'activation ou la désensibilisation, aient lieu et soient nécessaires à un trafic normal des récepteurs-canaux du glutamate (Greger et al. 2006, Priel et al. 2006, Nayeem et al. 2009). Les mécanismes liant changements conformationnels et trafics ne sont pas connus, mais pourraient passer par une entrave à la liaison avec des chaperonnes ou des sous-unités auxiliaires (Herguedas et al. 2013). Dans le cas des récepteurs NMDA, après la première association en dimères assurée par les NTDs, trois modèles d'assemblage sont proposés. Le premier passe par la formation d'homodimères GluN1-GluN1 et GluN2-GluN2 qui s'associent ensuite pour former les récepteurs complet (Meddows et al. 2001, Papadakis et al. 2004). Le deuxième propose la formation d'un homodimère GluN1-GluN1 qui intégrerait alors les deux autres sous-unités une à une (Atlason et al. 2007, Farina et al. 2011). Le troisième modèle propose une formation de tétramère par association de deux hétérodimères GluN1-GluN2 (Schuler et al. 2008).

### 1.3.3. Le domaine N-terminal ou NTD

Tous les récepteurs du glutamate possèdent un court peptide signal au début de leur séquence qui les adresse à la membrane et est ensuite clivé par protéolyse après l'insertion. La séquence polypeptidique qui suit forme le domaine N-terminal (NTD pour 'N-terminal domain', également appelé ATD pour 'amino-terminal domain'), qui a un rôle prépondérant dans l'assemblage des quatre monomères (Herguedas et al. 2013) et pour les récepteurs NMDA dans la modulation allostérique (voir section 1.4). Comme le domaine ABD, le domaine NTD a un repliement de forme bilobée : on parle de domaine 'clamshell' (bivalve) ou 'venus fly trap' (VFT, nom anglais de la plante carnivore Dionée attrape-mouche *Dionaea muscipula* qui capture les insectes par fermeture d'un piège de forme semblable). Ce domaine est homologue du domaine de liaison de l'agoniste des récepteurs métabotropiques de classe C dont font partie les récepteurs métabotropiques du glutamate, ainsi que des protéines bactériennes périplasmiques solubles de type LIVBP ('leucine/isoleucine/valine binding protein'). L'homologie est limitée en raison de différences structurales notables comme la localisation des ponts disulfures, des insertions, ou des délétions, mais elle suggère que les domaines NTD sont capables de lier des ligands au niveau de la crevasse entre les deux lobes (Clayton et al. 2009, Jin et al. 2009, Karakas et al. 2009, Kumar et al. 2009, Karakas et al. 2011). C'est en effet le cas pour la sous-unité GluN2 du récepteur NMDA, dont le NTD est capable de lier l'ion zinc  $Zn^{2+}$  (voir 1.4.4.1), mais pas pour les récepteurs AMPA ou kainate pour lesquels aucune molécule n'est connue pour se lier aux NTDs.

Les deux lobes du NTD sont appelés R1 et R2 (ou 'upper lobe' et 'lower lobe'). Ils sont reliés par une charnière formée par trois passages de la chaîne polypeptidique. L'extrémité N-terminale est située au sommet de R1 tandis que le linker vers l'ABD se trouve en bas de R2. À l'exception des NTD des récepteurs NMDA qui ont une conformation particulière twistée (Figure 1.3-3), la structure des NTDs des récepteurs ionotropiques du glutamate ressemble à celle de l'ABD de mGluR1 (Karakas et al. 2009, Karakas et al. 2011, Romero-Hernandez et al. 2016, Lu et al. 2017). Une comparaison avec ce domaine montre que les NTDs de GluA2 et de GluK2 présentent des conformations intermédiaires entre les états ouverts et fermés de mGluR1. Chez les

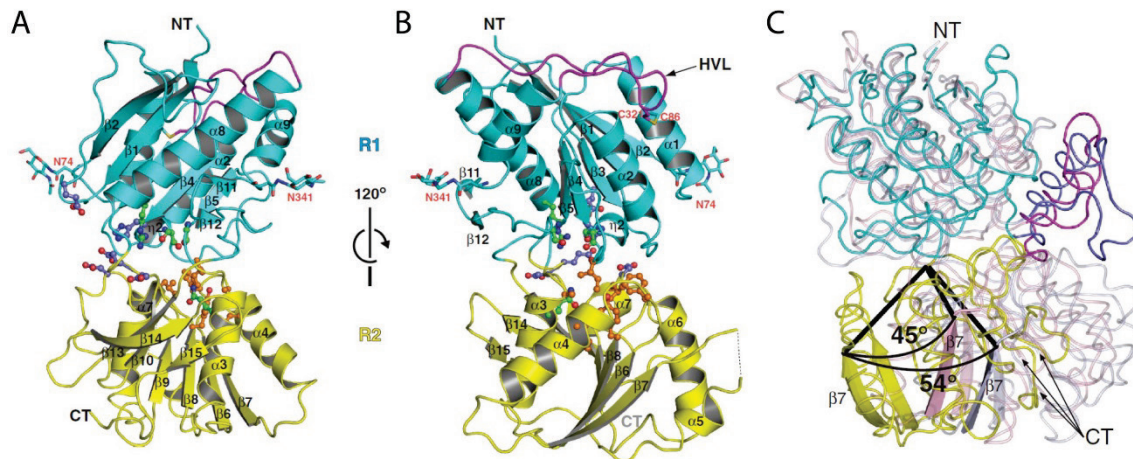
récepteurs AMPA et kainate, les dimères de NTD sont formés par de larges interfaces R1-R1 et R2-R2. En revanche, en raison de leur conformation twistée, la dimérisation des NTDs chez le récepteur NMDA se fait principalement par des contacts R1-R1 (Figure 1.4-4), un arrangement qui a des conséquences fonctionnelles (voir 1.4.2 et 1.4.4). Enfin, les NTDs sont les principaux sites de glycosylation des récepteurs-canaux du glutamate. Des indices de l'importance fonctionnelle de la glycosylation existent chez les récepteurs AMPA et kainate où elle affecte la désensibilisation et la taille des courants. Elle pourrait de plus expliquer des différences d'affinité, de trafic et de poids moléculaire observés entre différents systèmes d'expression (Clayton et al. 2009, Kumar et al. 2009).

Des expériences de délétion des NTDs ont montré que ces domaines ne sont pas essentiels au fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate, que ce soit chez le récepteur AMPA (Moykkynen et al. 2014), le récepteur kainate (Plested et al. 2008) ou le récepteur NMDA (Rachline et al. 2005, Gielen et al. 2009, Qiu et al. 2009, Yuan et al. 2009). Des récepteurs dont les NTDs sont manquants s'activent lors de la liaison de l'agoniste, et ce domaine est donc vu comme un domaine auxiliaire, en cohérence avec sa position distale par rapport à la membrane et à la machinerie d'activation formée par les ABDs (domaine où se lie l'agonistes) et le TMD (domaine où est situé le canal qui s'ouvre lors de la liaison de l'agoniste). Cependant, la délétion des NTDs n'est pas sans conséquence, particulièrement chez le récepteur NMDA où il exerce un contrôle intrinsèque et pharmacologique fort sur l'activité du récepteur. Il a en effet été démontré que les différences dans les NTDs et les linkers des différentes sous-unités GluN2 suffisent à expliquer une grande partie des principales différences fonctionnelles entre les récepteurs qui en sont constitués. (Gielen et al. 2009, Yuan et al. 2009). De plus, de nombreux modulateurs allostériques capables d'augmenter ou de diminuer l'activité du récepteur NMDA se lient au niveau des NTDs (Mony et al. 2011, Zhu and Paoletti 2015). Le rôle des NTDs chez les récepteurs NMDA est détaillé plus largement dans la sous-section 1.4.4.

Du fait des grandes dimensions de leur domaine extracellulaire qui s'avance d'environ 15 nm dans la fente synaptique, il a été proposé que les récepteurs-canaux du glutamate permettent des interactions trans-synaptiques directes. De tels contacts qui permettent la stabilisation et la maturation des synapses, ont été montrés entre les récepteurs



AMPA et la N-cadherin (Saglietti et al. 2007), entre les récepteurs NMDA et le récepteur d'éphrin (Takasu et al. 2002) et entre les récepteurs orphelins GluD2 et le précurseur de la cerebellin1 (Uemura and Mishina 2008, Kakegawa et al. 2009, Matsuda et al. 2010, Uemura et al. 2010, Elegheert et al. 2016). Les sites de fixation se trouvent au niveau des NTDs, les domaines les plus distaux par rapport à la membrane (Figure 1.2-8).



**Figure 1.3-3 : Le domaine N-terminal de GluN2 présente un twist particulier.**

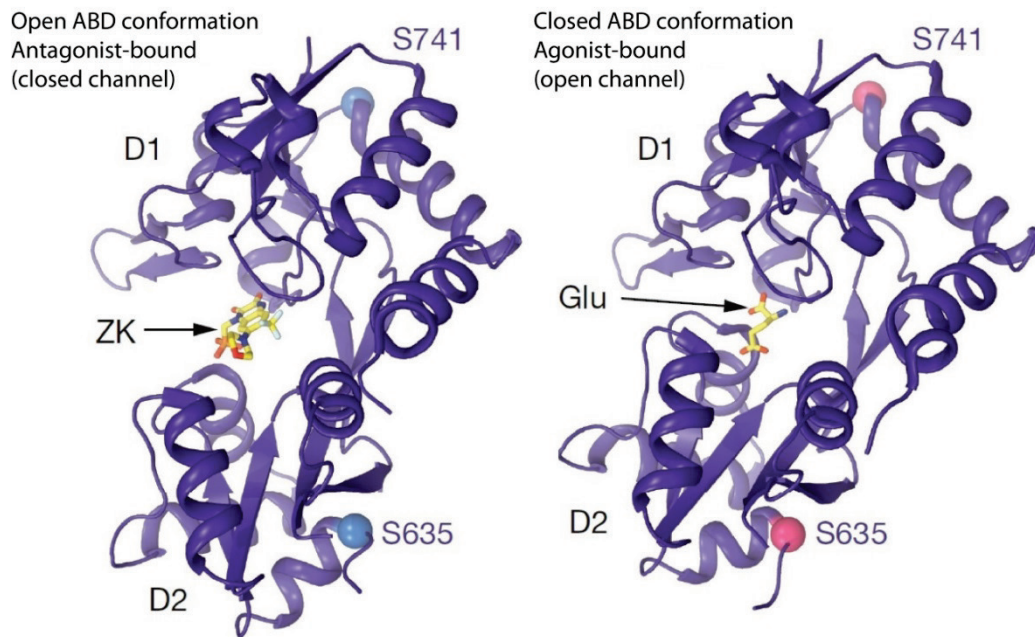
**A** Représentation en cartoon montrant l'organisation tertiaire du domaine, avec le lobe R1 en cyan et le lobe R2 en jaune. **B** Vue orientée face à la crevasse interlobe. **C** Superposition des domaines R1 illustrant l'angle de twist du lobe du bas du NTD de GluN2 par rapport aux NTDs de GluA2 et de GluK2 (en gris) : on remarque un décalage d'environ 50° par rapport aux autres domaines homologues de type LIVBP (Karakas et al. 2009).

### 1.3.4. Le domaine de liaison de l'agoniste ou ABD

Le domaine de liaison de l'agoniste (ABD pour 'agonist-binding domain', également appelé LBD pour 'ligand-binding domain') est formé de 2 segments de la séquence polypeptidique dénommés S1 et S2, et sa séquence est très conservée entre les différentes sous-unités. La liaison des segments S1 et S2 isolés permet de produire ce domaine de façon indépendante du reste de la sous-unité ce qui a permis de déterminer sa structure dans différentes conformations avant la publication des structures complètes (Armstrong and Gouaux 2000, Sun et al. 2002, Furukawa and Gouaux 2003, Furukawa et al. 2005). Comme le NTD, le domaine de liaison de l'agoniste présente une

forme bilobée, les deux lobes étant dénommés D1 et D2 (Figure 1.3-4). Il est apparenté à une autre famille de protéines périplasmiques bactériennes, les protéines LAOBP ('lysine/arginine/ornithine-binding protein'). Le site de liaison de l'agoniste se situe dans la crevasse centrale entre les deux lobes et est fortement conservé entre les différents récepteurs. L'agoniste endogène est le glutamate pour toutes les sous-unités de récepteurs-canaux du glutamate sauf GluN1 et GluN3 qui lient la glycine ou la D-sérine (la sous-unité GluD2 lie aussi la glycine ou la D-sérine mais sans induire l'ouverture d'un canal ionique). D'autres acides aminés de petite taille qui possèdent à la fois une fonction carboxyle et une amine primaire en position alpha comme l'aspartate sont des agonistes partiels du site de liaison du glutamate. L'AMPA, le kainate et le NMDA sont des agonistes ayant une certaine spécificité des sous-types de récepteurs du glutamate qui portent leur nom (Traynelis et al. 2010).

L'ABD est relié au NTD par un unique linker et au TMD par trois linkers. La comparaison de structures d'ABD non liées, liées à des agonistes ou liées à des antagonistes a permis de montrer que l'angle d'ouverture entre les deux lobes du 'clamshell' est variable (Armstrong and Gouaux 2000, Furukawa and Gouaux 2003). La liaison de l'agoniste stabilise une forme fermée de l'ABD. Comme les NTDs, les ABDs sont associés au sein du récepteur entier deux à deux par l'arrière via des interactions D1-D1 et D2-D2, leurs crevasses pointant dans des directions opposées. La stabilisation de la conformation fermée grâce à la liaison de l'agoniste aboutit à la rupture des interactions D2-D2 par écartement entre les lobes du bas. Les lobes du bas étant liés au TMD, ce mouvement est essentiel pour l'ouverture du canal (voir 1.3.7). Le mécanisme de désensibilisation (fermeture du canal alors que les agonistes sont toujours liés) des récepteurs AMPA et kainate est également décrit au niveau du dimère d'ABD (Sun et al. 2002, Furukawa et al. 2005), par une rupture d'une partie de l'interface D1-D1 qui aboutit à un pivotement du 'clamshell' fermé entier vers le bas. Ce mouvement rapproche les lobes du bas et abaisse la tension sur les linkers permettant ainsi la fermeture du pore (voir 1.3.7 également). Chez les récepteurs AMPA, l'épissage différentiel aboutit à deux isoformes de l'ABD dénommées flip et flop qui diffèrent au niveau de l'interface D1-D1 (Sommer et al. 1990), et qui ont donc des propriétés de désensibilisation différentes (Mosbacher et al. 1994, Koike et al. 2000).

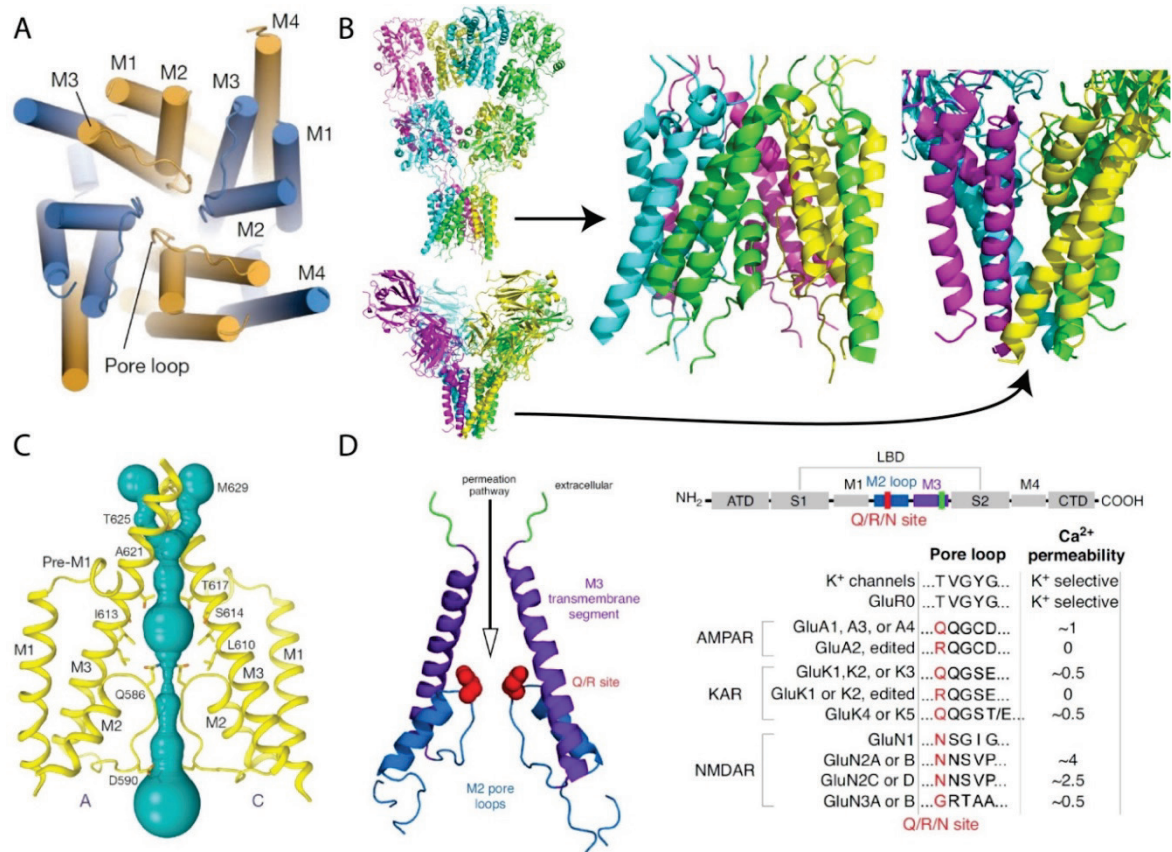


**Figure 1.3-4 : Le domaine de liaison de l'agoniste du récepteur AMPA en présence d'un antagoniste compétitif (ZK200775) et du glutamate, l'agoniste naturel.**

La forme liée au ZK correspond à une forme ouverte du domaine ABD (et donc à un récepteur inactif, canal fermé), tandis que la fixation du glutamate stabilise une forme fermée qui rapproche les deux lobes D1 et D2 (Twomey et al. 2017a).

### 1.3.5. Le domaine transmembranaire ou TMD

L'association des 4 sous-unités au niveau membranaire constitue le domaine transmembranaire qui contient le pore du canal. Il est relié aux ABDs par 3 types de linkers, dont l'arrangement diffère selon qu'on considère une sous-unité de type A/C ou une sous-unité de type B/D. Les hélices M1, M2 et M3 sont en position centrale et sont homologues à celles des canaux potassiques, mais leur position dans la membrane est inversée (Wo and Oswald 1995, Kuner et al. 2003). Le canal est très largement bordé par l'hélice transmembranaire M3 et la boucle intracellulaire réentrante M2 (Figure 1.3-5). L'hélice M1 se trouve en périphérie de cet arrangement central, tandis que l'hélice M4 est encore plus externe et possède une position décalée sur la sous-unité adjacente (Sobolevsky et al. 2009).



**Figure 1.3-5 : Le domaine transmembranaire des récepteurs-canaux du glutamate.**

**A** Schéma d'une vue intracellulaire de l'organisation du TMD illustrant la symétrie d'ordre 4 et la position des différentes hélices. **B** Vue des domaines transmembranaires du récepteur homotétramérique GluA2 (pdb 5WEO) et du canal potassique KcsA (5F9P) illustrant l'organisation homologue mais inversée. La courte hélice M2 est positionnée côté intracellulaire pour le récepteur AMPA et côté extracellulaire chez KcsA. L'hélice transmembranaire M4 est absente chez KcsA. **C** Vue latérale du canal fermé, illustrant la porte ('gate') (au niveau de A621) et le filtre de sélectivité (au niveau de la boucle réentrante) ainsi que la cavité qui se trouve entre les deux. **D** Le site Q/R/N localisé à l'extrémité de l'hélice M2 au niveau de la boucle réentrante contrôle les propriétés de perméabilité au calcium des récepteurs-canaux du glutamate (Lee et al. 2014, Focke et al. 2016, Twomey et al. 2017a, Wollmuth 2018).

L'hélice transmembranaire M3 est une région déterminante pour le contrôle de l'ouverture des récepteurs-canaux du glutamate. Au niveau supérieur, à proximité du côté extracellulaire de la membrane se trouve le motif le plus conservé de ces derniers : la région SYTANLAAF (Kuner et al. 2003). La récente structure ouverte du récepteur

AMPA a révélé des changements majeurs au sein de ce motif lors de l'activation, l'hélice se débobinant pour les sous-unités A/C et formant un coude pour les sous-unités B/D (voir 1.3.7). On parle de porte ('gate') pour cette partie du domaine transmembranaire qui contrôle l'ouverture.

C'est dans la boucle M2 que se trouve le site d'édition Q/R des récepteurs AMPA et kainate, également appelé site Q/R/N pour inclure la position équivalente chez les récepteurs NMDA. Ce site est situé près de l'extrémité de la boucle au niveau du rétrécissement inférieur du pore. Chez les récepteurs AMPA et kainate, l'édition de l'ARNm aboutit au remplacement de la glutamine par une arginine chez les sous-unités GluA2, GluK1 et GluK2 ce qui rend le canal imperméable au calcium (Sommer et al. 1991, Bass 2002). Du fait de cette propriété on classe souvent les récepteurs AMPA en deux catégories, ceux qui ne contiennent pas GluA2 et sont perméables au calcium et ceux qui contiennent GluA2 et sont imperméables. L'édition est moins complète chez les récepteurs kainate (Contractor et al. 2011). On parle de filtre de sélectivité pour la région bordant le canal et contenant le site Q/R/N car elle est responsable d'une grande partie de la sélectivité du pore. Un élargissement du canal entre ce filtre de sélectivité et la porte forme une sorte de cavité (Figure 1.3-5C). Chez les récepteurs NMDA, la sélectivité pour le calcium est plus forte, en partie à cause du site QRN (Jatzke et al. 2002) mais également en raison d'un motif situé plus haut à la limite entre le canal et le milieu extracellulaire : le motif DRPEER de la sous-unité GluN1 dont le mécanisme de sélectivité est encore mal compris (Watanabe et al. 2002, Karakas and Furukawa 2014, Wollmuth 2018).

Une propriété phare des récepteurs NMDA réside dans la capacité des ions  $Mg^{2+}$  à bloquer le passage du courant ((Mayer et al. 1984, Nowak et al. 1984, Ascher et al. 1988) ; voir aussi 1.4.8). Cette caractéristique est fortement dépendante du potentiel membranaire, on parle de blocage magnésium dépendant du voltage. Le récepteur NMDA n'est pas perméable au magnésium, bien que celui-ci soit plus petit que le calcium, probablement car l'ion  $Mg^{2+}$  maintient sa sphère d'hydratation à l'intérieur du pore. Cette propriété moléculaire permet au récepteur NMDA d'être un « détecteur de coïncidence » : la liaison des agonistes doit s'accompagner d'une dépolarisation membranaire pour permettre le passage du courant, faute de quoi, le blocage par le

magnésium empêche l'entrée de calcium dans la cellule, même si le canal est ouvert. Ce phénomène est d'importance capitale pour l'induction de la plasticité synaptique (voir Figure 1.2-6 ; Collingridge 1987).

Le TMD interagit au niveau membranaire avec des protéines dites auxiliaires dont les plus connues sont les TARP ('transmembrane AMPA receptor regulatory protein'). La zone de contact entre le récepteur et les protéines auxiliaires est intracellulaire mais aussi extracellulaire. La stœchiométrie de ces interactions n'est pas encore établie avec certitude, elle serait de 2 à 4 pour  $\gamma$ -2 (également appelée stargazin), la protéine la plus étudiée qui se lie au récepteur AMPA. Récemment, plusieurs modélisations de domaines transmembranaires actifs (i.e. pore ouvert) ont été proposées (Mesbahi-Vasey et al. 2017, Pang and Zhou 2017) avant que ne paraisse la première structure active d'un récepteur canal du glutamate : le récepteur homotétramérique GluA2 associé avec stargazin (Twomey et al. 2017a).

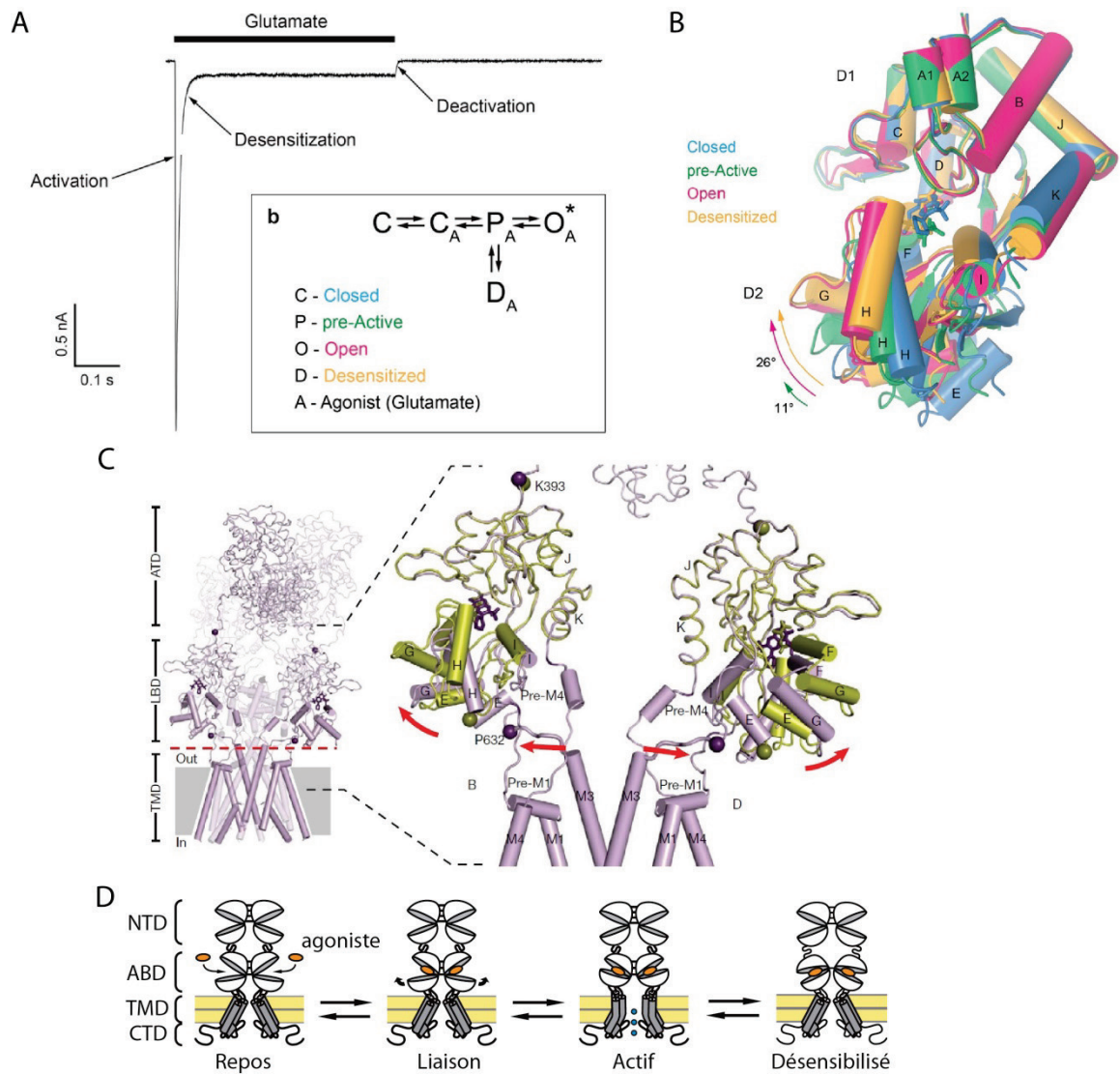
### **1.3.6. Le domaine C-terminal**

Le domaine intracellulaire carboxy-terminal (CTD) est le domaine le plus variable entre les différents récepteurs-canaux du glutamate autant en termes de séquence que de taille (Traynelis et al. 2010, Martel et al. 2012, Ryan et al. 2013). Sa structure n'est pas connue. Son absence n'empêche pas le fonctionnement du récepteur mais provoque des problèmes de régulation car il contient des sites de liaison avec des protéines intracellulaires et des sites de phosphorylation qui sont impliqués dans le contrôle de son trafic intracellulaire et de sa fonction. L'action d'une tyrosine kinase intracellulaire aboutit par exemple à une diminution de la sensibilité au zinc alors que ce dernier se lie du côté extracellulaire de la protéine (Zheng et al. 1998). Le domaine C-terminal contient également des signaux de rétention dans le réticulum endoplasmique (Horak and Wenthold 2009). Les partenaires intracellulaires des récepteurs canaux du glutamate sont extrêmement variés et comprennent entre autres des protéines du cytosquelette, des protéines d'ancrage et d'échafaudage, des protéines adaptateur et des protéines de voies de signalisation (Husi et al. 2000).

### 1.3.7. Mécanisme d'activation et de désensibilisation

La première structure ouverte d'un récepteur ionotropique du glutamate, obtenue par cryo-microscopie électronique d'un homotétramère AMPA, est parue récemment (Figure 1.3-7C). Elle est en accord avec le mécanisme d'activation générique des récepteurs-canaux du glutamate et permet de replacer les changements de conformation des domaines ABD dans le contexte du récepteur entier (Twomey et al. 2017a). Bien que les iGluR soient des tétramères, le modèle proposé est un fonctionnement en dimère de dimère, conformément à l'arrangement des domaines extracellulaires. Le glutamate stabilise la forme fermée de l'ABD par sa liaison dans la crevasse interlobe. Dans cette conformation, les deux lobes du bas (D2) au sein d'un dimère d'ABD sont éloignés l'un de l'autre (Figure 1.3-6 et Figure 1.3-7). Cette séparation se traduit par une tension au niveau des linkers reliés au TMD permettant l'ouverture du canal ionique. Les sous-unités A/C et B/D n'étant pas équivalentes, on constate une contribution différente de ces sous-unités à l'ouverture du pore, la participation des sous-unités B/D étant plus importante (Banke and Traynelis 2003, Sobolevsky et al. 2007, Kazi et al. 2014). L'ouverture de la porte d'activation ('gate') est également différente avec un coude au niveau des sous-unités B/D qui n'est pas présent sur les deux autres sous-unités.

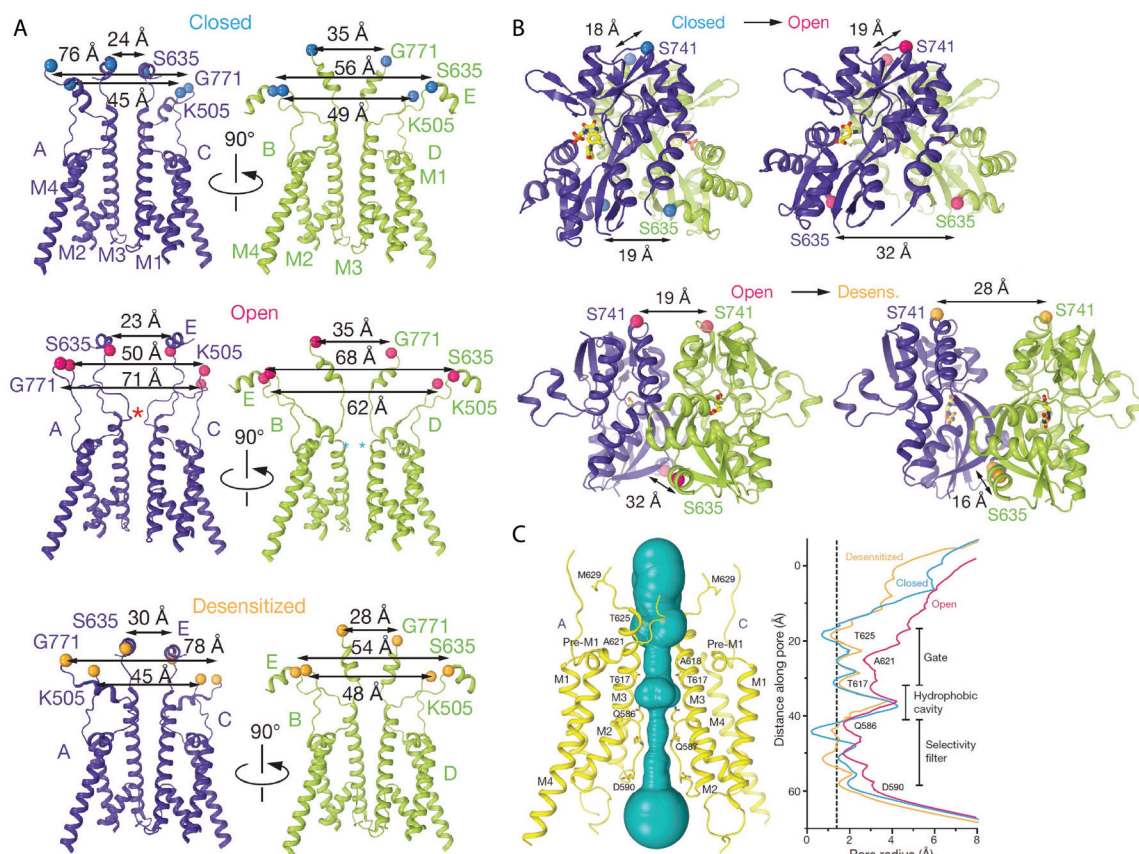
Ce mécanisme d'activation d'abord développé pour les récepteurs AMPA a été généralisé aux récepteurs NMDA qui présentent certaines particularités : Les sous-unités GluN1 et GluN3 du récepteur NMDA ne lient pas le glutamate mais la glycine (ou la D-sérine). De plus, contrairement au récepteur AMPA (Smith and Howe 2000), le récepteur NMDA ne s'active que lorsque les 4 sites de fixation des agonistes sont occupés, la présence de glutamate et de glycine est donc obligatoire pour l'ouverture du récepteur NMDA canonique GluN1/GluN2 (Stern et al. 1992, Stern et al. 1994, Chen et al. 1999b). Enfin, l'arrangement des domaines extracellulaires du récepteur NMDA présente des différences avec celui des récepteurs AMPA décrites plus loin (voir 1.4.2).



**Figure 1.3-6 : Mécanisme d'activation et de désensibilisation du récepteur AMPA.**

**A** Enregistrement représentatif de courants montrant l'activation et la désensibilisation d'homotétramères GluA2 en réponse à l'application de glutamate pendant une demi-seconde. Les courants sont enregistrés en configuration cellule entière au potentiel de membrane de -60 mV sur des récepteurs exprimés par des cellules HEK. **B** Superposition de structures de monomères isolés d'ABD dans différents états conformationnels illustrant les différents degrés de fermeture du 'clamshell' (Twomey and Sobolevsky 2018). **C** Structure des sous-unités A et C de l'homotétramère GluA2 illustrant le couplage entre la fermeture des 'clamshells' et l'ouverture du pore (Sobolevsky et al. 2009). **D** Représentation schématique de l'activation et de la désensibilisation du récepteur. Seul un dimère est représenté en faisant abstraction du 'domain swapping'.





**Figure 1.3-7 : Structures illustrant l'activation et la désensibilisation du récepteur AMPA.**

**A** Structure du domaine transmembranaire des états fermé en haut, ouvert au milieu et désensibilisé en bas avec les sous-unités en position A/C à gauche en bleu et les sous-unités en position B/D à droite en vert. **B** Structures de dimères d'ABD avec en bleu une sous-unité A/C et en vert une sous-unité B/D. En haut, fermeture des 'clamshells' faisant passer le canal de l'état fermé à l'état ouvert. On note l'écartement des deux lobes du bas. En bas, passage d'un canal ouvert à un canal désensibilisé par rupture de l'interface D2-D2 permettant le rapprochement des lobes du bas. **C** À gauche, illustration du conduit de passage des ions en cyan avec les résidus qui le bordent dans les hélices M2 et M3 des sous-unités en position A/C. À droite, rayon du pore en dans l'état ouvert en rose, fermé en bleu et désensibilisé en orange (Twomey et al. 2017a).

Les récepteurs AMPA et kainate désensibilisent lors d'exposition prolongées au glutamate en une dizaine de millisecondes (Sun et al. 2002, Weston et al. 2006). Comme pour le mécanisme d'activation, les structure complètes parues récemment sont en accord avec le mécanisme de désensibilisation des récepteurs AMPA proposé sur la base

de l'étude de dimères isolés et permettent son intégration au sein d'un récepteur entier (Twomey et al. 2017b). Les récepteurs désensibilisés présentent une séparation des deux lobes du haut de l'ABD : l'interface D1-D1 de dimérisation des ABDs est rompue ce qui permet un découplage entre la fermeture des ABD et l'ouverture du canal ionique (Figure 1.3-6 et Figure 1.3-7). L'ABD est fermé, stabilisé par la liaison du glutamate, mais le basculement des deux domaines d'un dimère d'ABD l'un par rapport à l'autre qui implique la rupture des interactions D1-D1 rapproche les deux lobes D2 et réduit l'écartement au niveau où les linkers sont branchés, permettant la fermeture du canal. Pour le récepteur kainate en revanche, une structure complète dans l'état désensibilisé fait état d'une conformation en rosette tétramérique inattendue des domaines ABD (Meyerson et al. 2016).

Les récepteurs NMDA, ne présentent pas de désensibilisation rapide comparable mais on peut observer une diminution de leur activité lors d'expositions prolongées au glutamate dans certaines conditions : Tout d'abord lorsque la glycine n'est pas saturante, la liaison du glutamate diminue légèrement l'affinité pour cette dernière ce qui provoque une diminution du courant (Mayer et al. 1989, Lester et al. 1993). Ensuite, pour les récepteurs GluN1/GluN2A, la liaison du glutamate au récepteur conduit à une augmentation de l'affinité pour le zinc qui est un inhibiteur allostérique négatif (voir 1.4.4.1), et peut donc conduire à une diminution de l'activité liée à une augmentation de l'inhibition zinc (Zheng et al. 2001, Erreger et al. 2005). Enfin, l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium et la dialyse du milieu intracellulaire par le contenu de la pipette de patch peuvent réduire l'activité des récepteurs NMDA par des mécanismes liés au domaine carboxy-terminal (Legendre et al. 1993).

## 1.4. La modulation allostérique chez les récepteurs NMDA

### 1.4.1. Le concept d'allostérie

Défini tout d'abord pour l'étude des enzymes, le concept d'allostérie a depuis été largement généralisé aux autres protéines et en particulier aux récepteurs pour le mécanisme liant le site senseur et le site effecteur (Monod et al. 1965, Koshland et al. 1966, Changeux and Christopoulos 2016, Foster and Conn 2017). Une interaction allostérique est une interaction indirecte entre deux sites distincts par un changement de conformation discret et réversible de la protéine appelé « transition allostérique ». Dans le cas des récepteurs, cette transition est favorisée par la liaison de l'agoniste endogène qui se lie au niveau du site de liaison de l'agoniste (site senseur) ou site orthostérique, aboutissant à l'ouverture du canal (site effecteur, Figure 1.4-1). Ainsi, pour les récepteurs NMDA, les sites orthostériques sont les sites de fixation du glutamate et de la glycine, au sein de l'ABD de GluN2 et de GluN1 respectivement. Certaines molécules en revanche, contrairement à un inhibiteur compétitif ou à un agoniste, agissent au niveau d'un site distinct du site orthostérique, appelé « allostérique » et augmentent ou diminuent l'activité de la protéine sans être suffisants pour déclencher la réponse biologique lorsqu'ils sont utilisés seuls. Ils sont appelés modulateurs allostériques positifs (PAM) lorsqu'ils augmentent l'activité du récepteur et modulateur allostérique négatif (NAM) lorsqu'ils la réduisent (on parle aussi de potentiateur ou d'inhibiteur allostérique).

Deux modèles sont classiquement proposés pour expliquer les transitions allostériques : le premier, qui date de 1965, est appelé « Monod-Wyman-Changeux » (MWC ; Monod et al. 1965) du nom de ses auteurs. Il propose que les différents états de la protéine

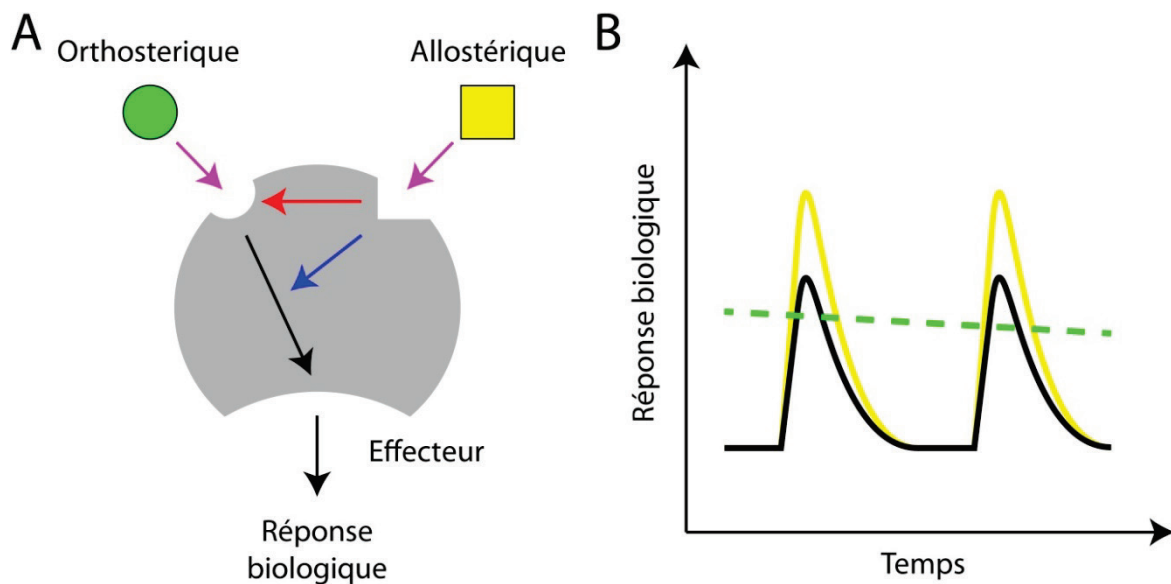
(inactif, actif, inhibé...) préexistent et que les ligands ne font que stabiliser l'état auquel ils se lient préférentiellement, aboutissant à un déplacement des équilibres en faveur de celui-ci. Le deuxième mécanisme est celui de Koshland, Nemethy et Filmer (KNF ; Koshland et al. 1966), qualifié de mécanisme « à ajustement induit » ('induced fit'). Il avance des changements de conformation successifs provoqués par la liaison des ligands. Ce modèle exclut les changements conformationnels en l'absence des ligands.

Les modulateurs allostériques des récepteurs ionotropiques du glutamate ont suscité beaucoup d'attention en raison de leurs possibilités de réglage fin de l'activité des récepteurs et de leur potentielle utilisation comme agents thérapeutiques. Ils offrent différents avantages par rapport aux molécules au mode d'action compétitif. En effet, le site orthostérique est généralement très conservé ce qui limite les possibilités de sélectivité entre les différentes sous-unités de récepteurs. De plus, une action à ce niveau sera de type « tout ou rien » (Figure 1.4-1), suractivant (pour les agonistes), ou diminuant de façon constitutive l'activité du récepteur (pour les antagonistes compétitifs). En revanche, les sites allostériques sont moins conservés d'une sous-unité à l'autre car ils ne sont pas soumis à la pression de sélection qu'est la nécessité de lier l'agoniste, le modulateur a donc plus de chances d'être spécifiques de certains sous-types de récepteurs, permettant un ciblage plus fin. De plus, un modulateur allostérique n'entre pas en compétition avec le ligand endogène, et il ne modifie pas le patron temporel d'activation du récepteur ce qui lui permet généralement d'être mieux toléré en utilisation thérapeutique (Mony et al. 2011).

On distingue parmi les modulateurs allostériques différents types d'effets détecté sur les réponses des protéines cibles (Figure 1.4-2). Les modulateurs peuvent agir en augmentant (pour un PAM) ou en diminuant (pour un NAM) la réponse maximale du récepteur sans altérer la valeur de l' $EC_{50}$ , on parle alors de réponse de type 1. L'action du modulateur peut au contraire être un déplacement de l' $EC_{50}$  vers une valeur plus faible (PAM) ou plus élevée (NAM) sans modifier la réponse maximale. On parle alors d'effet de type 2 (Hackos and Hanson 2017).

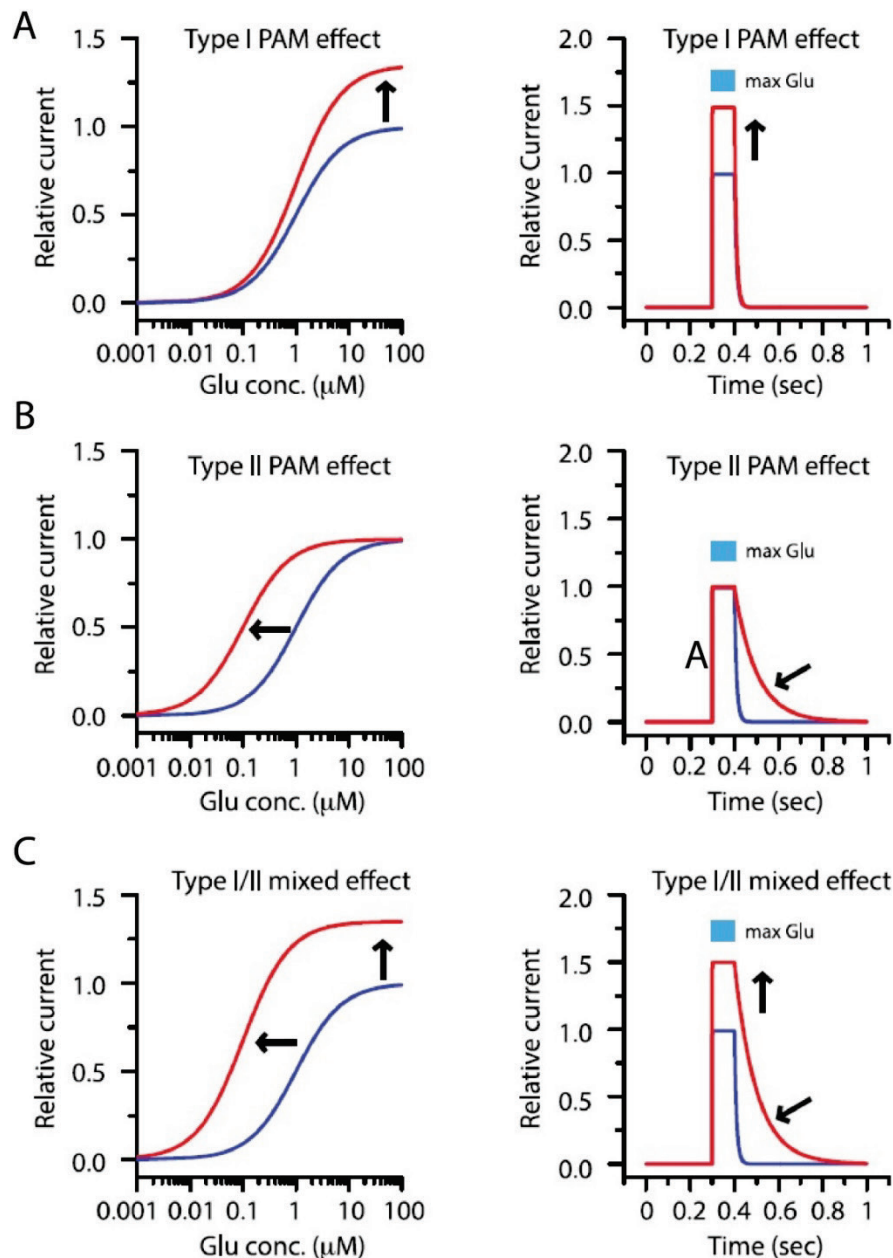
Une différence cruciale entre ces deux types d'effets est qu'un modulateur de type 2 n'aura aucun effet à une concentration saturante d'agoniste tandis qu'un modulateur de

type 1 fonctionnera tout aussi bien à toutes les concentrations. En revanche, un modulateur de type 2 aura un impact sur la cinétique d'action macroscopique du récepteur car un changement d' $EC_{50}$  est lié aux constantes d'activation et de désactivation apparentes du récepteur. Un modulateur allostérique positif de type 2 par exemple qui décale l' $EC_{50}$  vers la gauche implique soit une activation plus rapide, soit une désactivation plus lente, soit les deux. Un tel effet est important dans le cas du récepteur NMDA car au-delà du courant maximal atteint, c'est le décours temporel de son activité qui définit la quantité de calcium qui entre dans la cellule ainsi que la fenêtre de temps pour l'intégration synaptique.



**Figure 1.4-1 : Le concept de modulation allostérique pour un récepteur.**

**A** Schéma récapitulant les différents sites définis dans le concept d'allostérie appliqué aux récepteurs. Le site orthostérique reconnaît l'agoniste endogène, le site effecteur propage le signal transmis par l'agoniste et le site allostérique module l'interaction allostérique entre les deux précédents. Les flèches violettes représentent l'affinité des ligands pour leur site de liaison. La flèche rouge indique une action du modulateur allostérique sur l'affinité du récepteur pour l'agoniste alors que la flèche bleue indique une action du modulateur sur l'efficacité de l'agoniste. **B** Patron d'activation physiologique théorique d'un récepteur en noir, avec en jaune l'action d'un modulateur allostérique positif et en vert l'action d'un agoniste compétitif. Le modulateur allostérique n'interfère pas avec le patron d'activation endogène ce qui participe à une meilleure tolérance dans une utilisation thérapeutique (Conn et al. 2009, Changeux and Christopoulos 2016).



**Figure 1.4-2 : Les différents types d'effets d'un modulateur allostérique positif.**

**A** Effet de type 1 qui modifie la réponse maximale sans modifier l' $EC_{50}$  et la cinétique d'activation. **B** Effet de type 2 qui déplace l' $EC_{50}$  et peut modifier la cinétique d'action. **C** Effet mixte. Les courants sont normalisés à la réponse à une concentration saturante d'agoniste en absence de modulateur (Hackos and Hanson 2017).

En réalité, malgré cette distinction théorique entre type 1 et type 2, les modulateurs ont en général un effet qui est un mélange des deux actions et l'observation macroscopique de l'effet d'un modulateur ne permet pas directement la compréhension de son

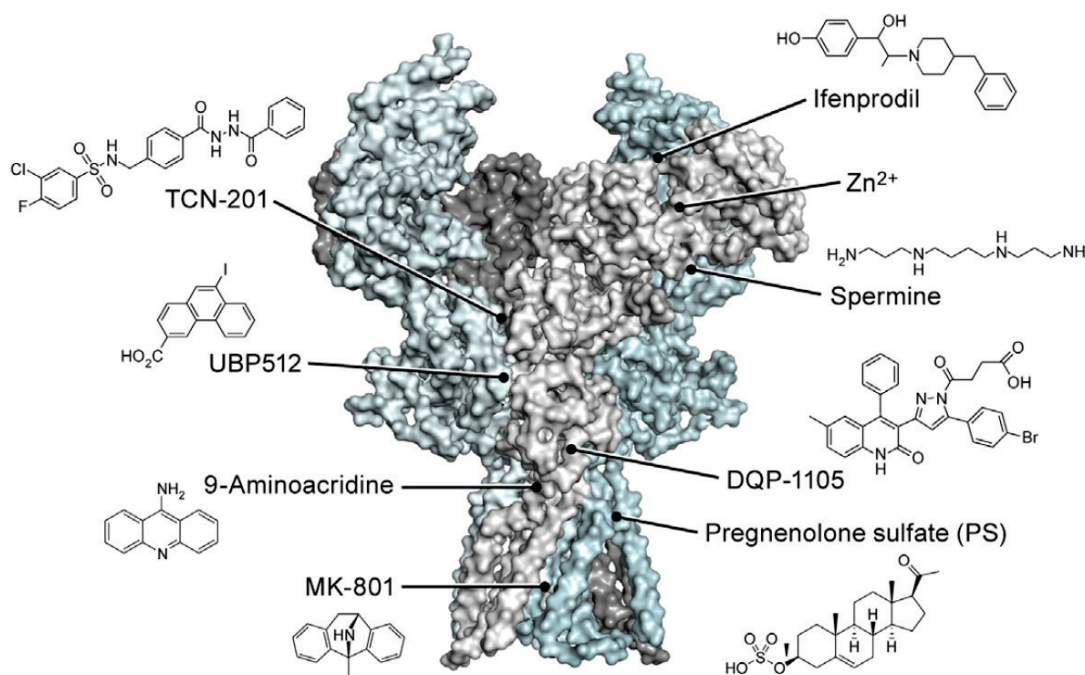
mécanisme d'action. En particulier, un effet de type 2 n'implique pas nécessairement une action directe sur le site de liaison de l'agoniste et il faut bien distinguer affinité apparente (mesurée par l' $EC_{50}$ ) et affinité microscopique. Un modulateur qui agit en bloquant le récepteur dans un état actif va par exemple diminuer énormément l' $EC_{50}$  et ralentir la cinétique macroscopique de désactivation sans pour autant modifier l'affinité de l'agoniste pour son site de liaison (Hackos and Hanson 2017).

## **1.4.2. Spécificité structurale des récepteurs NMDA et allostérie**

Les récepteurs NMDA auxquels nous nous limiterons ici possèdent des sites de modulation allostériques plus nombreux et plus variés que les autres familles de récepteurs-canaux du glutamate, notamment car diverses molécules endogènes comme les ions zinc  $Zn^{2+}$  et la spermine ou artificielles comme l'ifenprodil se lient au niveau de leurs NTDs (Figure 1.4-3 ; Zhu and Paoletti 2015).

Cette propriété s'accompagne de différences structurales notables entre ces récepteurs et les autres. Tout d'abord, leurs NTDs possèdent l'organisation bilobée classique mais avec un twist d'environ  $50^\circ$  entre les deux lobes (Figure 1.3-3) lorsqu'on les compare aux autres NTDs de type LIVBP (Karakas et al. 2009, Karakas et al. 2011, Stroebel et al. 2011, Romero-Hernandez et al. 2016). De ce fait, le dimère de NTDs du récepteur NMDA possède un arrangement différent de l'apposition dos à dos classique des deux 'clamshells' (interactions R1-R1 et R2-R2), mettant en jeu principalement des interactions du lobe du haut (R1-R1, Figure 1.4-4). Les lobes R2 de GluN1 et de GluN2 sont donc relativement libres de mouvement, et des mouvements d'ouverture/fermeture et de twist des 'clamshells' ont été décrits (Zhu et al. 2013). Ensuite, les deux dimères d'ABDs des récepteurs NMDA interagissent fortement par des contacts latéraux mettant en jeu le lobe du bas de l'ABD de GluN1 et les deux lobes de celui de GluN2. Ces contacts ont lieu entre les sous-unités adjacentes n'appartenant pas au même dimère (Figure 1.4-5). Au contraire, les récepteurs AMPA et kainate montrent généralement des contacts en diagonale entre les dimères d'ABD (Figure 1.4-5, voir aussi Figure 1.3-2A, couche ABD), qui mettent en jeu les sous-unités A/C ou B/D avec de

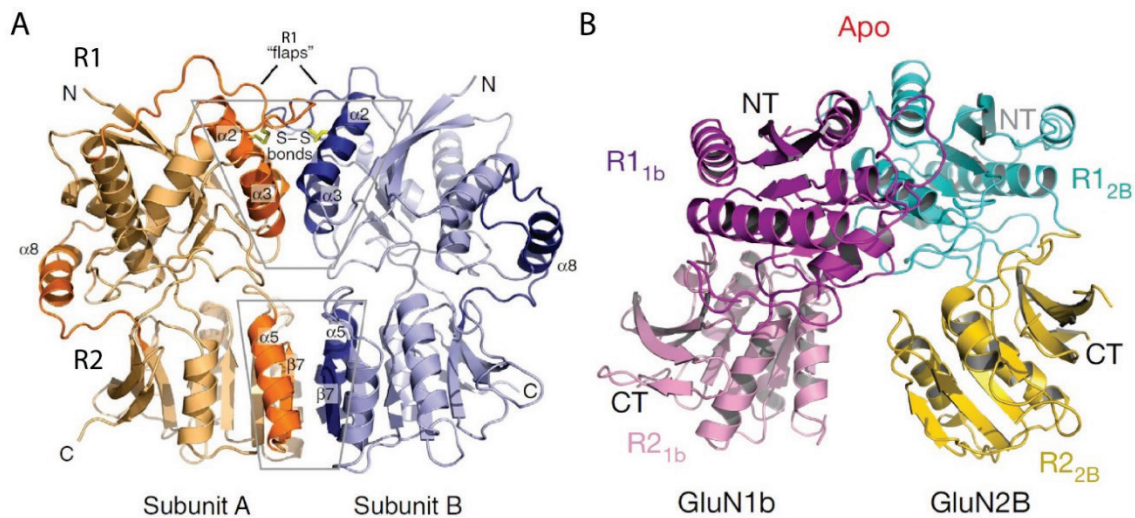
petites surfaces d'interactions (Armstrong et al. 2006, Plested and Mayer 2009, Sobolevsky et al. 2009, Das et al. 2010, Salazar et al. 2017). Enfin, la région extracellulaire des récepteurs NMDA est beaucoup plus compacte, donnant au récepteur un aspect de montgolfière, tandis que les récepteurs AMPA ont une forme en « Y » avec des espaces beaucoup plus grands entre les différents domaines (Figure 1.4-6). Les larges surfaces d'interactions entre la couche de domaines NTD et la couche de domaines ABD sont probablement essentielles pour la transmission de l'information de liaison des modulateurs allostériques qui ciblent les NTD vers la machinerie d'ouverture constituée des couches ABD et TMD (Zhu and Paoletti 2015).



**Figure 1.4-3 : Structure du récepteur NMDA montrant la localisation de nombreux sites de liaison de modulateurs allostériques.**

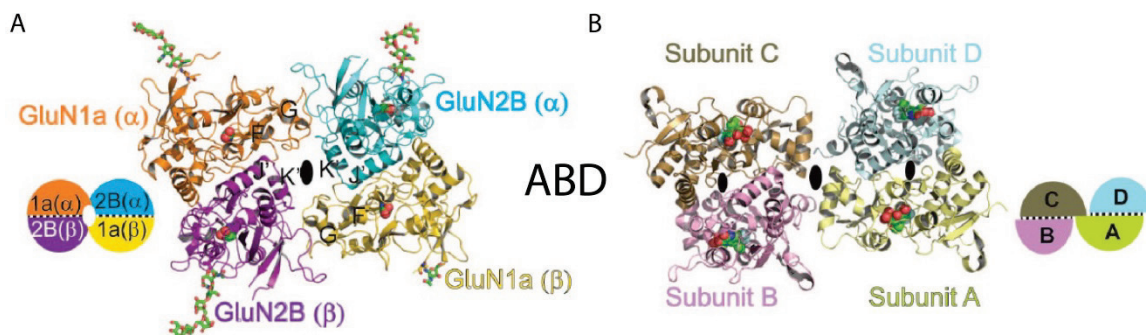
Contrairement aux autres récepteurs-canaux du glutamate, certains sites de liaison sont situés au niveau de la couche de domaines NTD. Chez le récepteur NMDA, cette dernière présente de larges surfaces d'interaction avec la couche de domaines ABD sous-jacente (Zhu and Gouaux 2017).





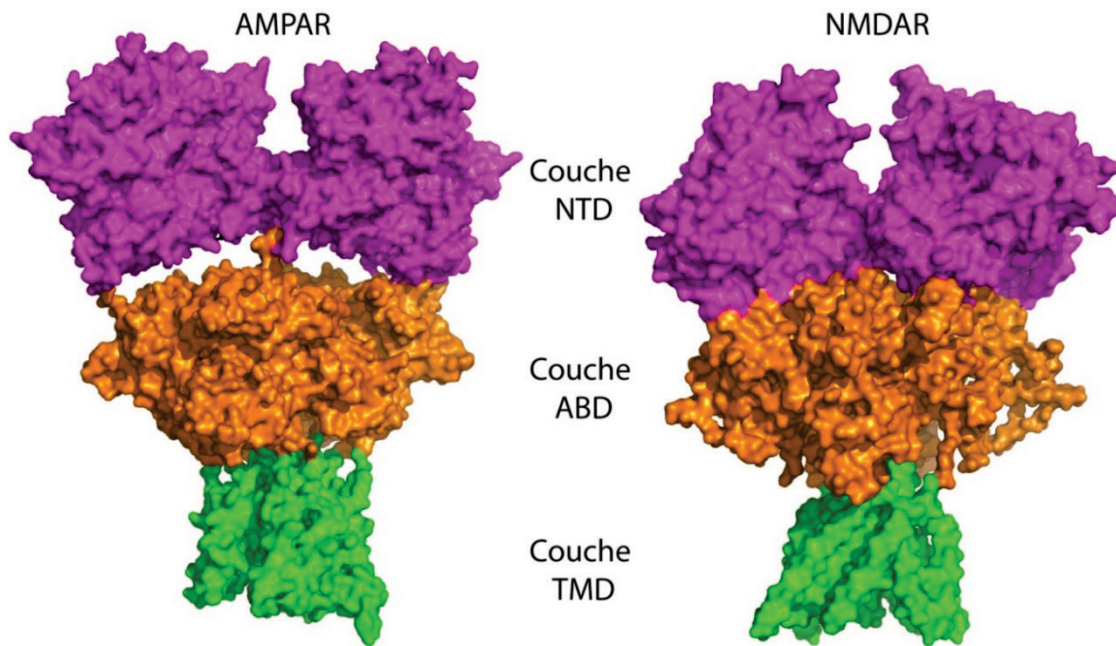
**Figure 1.4-4 : Comparaison du dimère de NTD entre le récepteur homotétramérique GluA2 et le récepteur NMDA GluN1/GluN2B.**

**A** Chez le récepteur AMPA, on remarque de larges surfaces d'interactions entre les deux lobes du haut R1 et entre les deux lobes du bas R2 (Jin et al. 2009, Kumar et al. 2009). **B** Chez le récepteur NMDA, les interactions entre les deux lobes du haut R1 sont présentes. On constate cependant que les lobes du bas R2, qui sont twistés chez ce récepteur, interagissent peu et sont donc plus libres de mouvement (Karakas et al. 2011, Tajima et al. 2016).



**Figure 1.4-5 : Comparaison de l'arrangement de la couche ABD entre le récepteur NMDA GluN1/GluN2B et le récepteur AMPA GluA2.**

Vue du dessus de la couche ABD des récepteurs NMDA en **A** et AMPA en **B**. Les deux dimères d'ABD interagissent l'un avec l'autre par les côtés chez les récepteurs NMDA, avec des interactions mettant en jeu les deux lobes. Chez les récepteurs AMPA, les interactions entre dimères se font majoritairement en diagonale entre les sous-unités proximales mais l'arrangement semble plus dynamique du fait de la moindre compaction globale du récepteur (Karakas and Furukawa 2014, Salazar et al. 2017).



**Figure 1.4-6 : Comparaison de l'architecture globale des récepteurs AMPA et NMDA.**

On note à gauche la forme en 'Y' du récepteur AMPA, et la séparation nette entre la couche NTD et la couche ABD. A droite, le récepteur NMDA est plus compact, avec une forme globale en montgolfière.

### 1.4.3. Modulation par les protons

Dans le contexte physiologique, les protons extracellulaires inhibent les récepteurs NMDA de façon non compétitive et non dépendante du potentiel de membrane, ce qui indique que leur effet ne passe pas par une dissociation des agonistes ou par le blocage du pore (Tang et al. 1990, Traynelis and Cull-Candy 1990, Traynelis and Cull-Candy 1991). La sensibilité des récepteurs NMDA est dépendante de leur composition en termes de sous-unité. Les récepteurs qui contiennent GluN2C sont les moins sensibles avec un pH d' $IC_{50}$  de 6.5 environ (Traynelis et al. 1995, Low et al. 2003). Les récepteurs les plus sensibles sont les récepteurs GluN1a/GluN2B et GluN1a/GluN2D (pH d' $IC_{50}$  de 7.4). Les récepteurs GluN1/GluN2A ont une sensibilité intermédiaire. Les récepteurs contenant GluN1b ont une sensibilité faible, le pH d' $IC_{50}$  est de 6.7 avec GluN2A, GluN2B ou GluN2D et moindre avec GluN2C. On remarque qu'au pH physiologique, l'activité de la

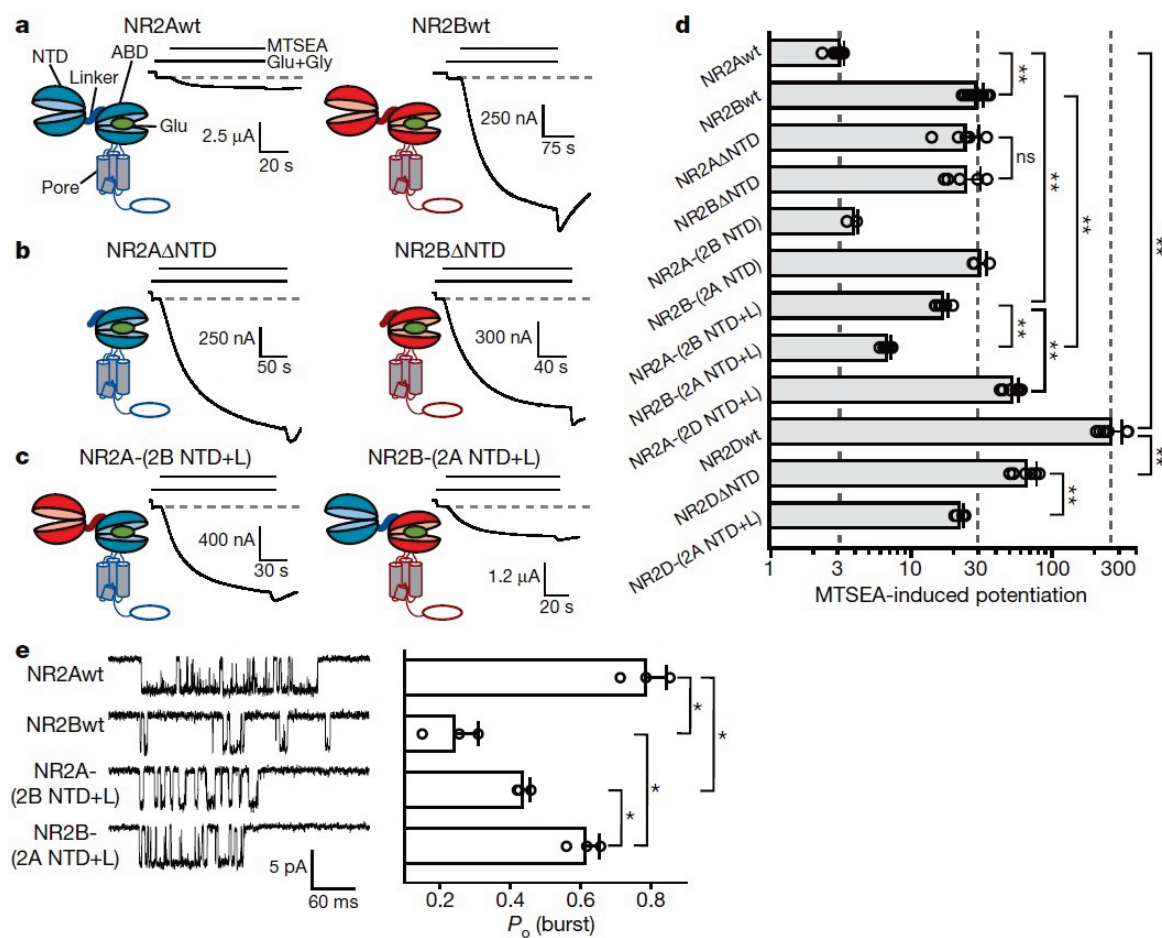
plupart des récepteurs NMDA est réduite de moitié par rapport à leur activité maximale à cause de l'inhibition proton. Les variations de pH, même faibles, ont donc des conséquences sur leur niveau d'activité du récepteur. L'inhibition par les protons permet ainsi par exemple de réduire l'excitotoxicité lors de l'ischémie cérébrale et de l'acidification du milieu extracellulaire qui l'accompagne (Tombaugh and Sapolsky 1993, Yuan et al. 2015).

Malgré de nombreuses études de mutagenèse dirigée, le site de liaison et/ou d'action des protons, s'il est unique, n'a pas été identifié (Traynelis et al. 1998, Masuko et al. 1999, Low et al. 2000, Low et al. 2003). Les résidus qui contrôlent la sensibilité aux protons sont disséminés dans la séquence des sous-unités GluN1 et GluN2, avec une préférence pour le motif SYTANLAAF de la porte externe et les linkers qui relient les hélices transmembranaires TM2 et TM3 au domaine de liaison de l'agoniste. On peut donc penser que l'action des ions  $H^+$  est relativement directe au niveau de la transduction entre domaine de liaison de l'agoniste et porte du canal. Il a été montré que des mutations qui déstabilisent l'interface D1-D1 du dimère d'ABDs des récepteurs NMDA (celle qui contrôle la désensibilisation chez les récepteurs AMPA) augmentent fortement la sensibilité aux protons de ces récepteurs (Gielen et al. 2008). Cette constatation a amené à s'interroger sur un rôle de cette interface dans l'inhibition allostérique chez les récepteurs NMDA, par analogie avec son rôle bien caractérisé dans la désensibilisation des récepteurs AMPA.

De nombreux modulateurs allostériques des récepteurs NMDA modifient sa sensibilité au pH extracellulaire, et vice versa (Mott et al. 1998, Yuan et al. 2015). L'action de l'ifenprodil, du zinc, des polyamines, ou encore celle de l'exon 5 qui est présent chez GluN1b mais pas GluN1a (Traynelis et al. 1995, Regan et al. 2018) mettent en jeu un effet du pH ce qui est cohérent avec un effet direct des protons sur la machinerie d'ouverture.

### **1.4.4. Modulateurs se liant dans la région NTD**

Contrairement aux récepteurs AMPA pour lesquels le rôle fonctionnel des NTDs est réduit, ces domaines contrôlent plusieurs paramètres biophysiques clés chez les récepteurs NMDA (Gielen et al. 2009, Yuan et al. 2009, Hansen et al. 2010, Paoletti 2011). Ainsi des expériences mettant en jeu des chimères de différentes sous-unités GluN2 ont mis en évidence que la région NTD de GluN2 et le linker qui la relie à l'ABD sont responsables des différences de probabilité d'ouverture, de cinétique de désactivation et d' $EC_{50}$  du glutamate et de la glycine entre les différents sous-types de récepteurs GluN1/GluN2 (Figure 1.4-7). Cette propriété est cohérente avec l'existence de divers sites de modulation positive et négative dans cette région et avec les différences structurales évoquées plus haut. Le mode d'action des NTDs met en jeu des mouvements d'ouverture/fermeture et de twist/détwist des 'clamshells' mais le mécanisme par lequel ces mouvements contrôlent l'activité du récepteur n'a pas encore été élucidé (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2009a, Zhu et al. 2013).



**Figure 1.4-7 : Les différences de probabilité d'ouverture entre les différentes sous-unités GluN2 sont liées au domaine NTD et au lien qui relie ce domaine à l'ABD.**

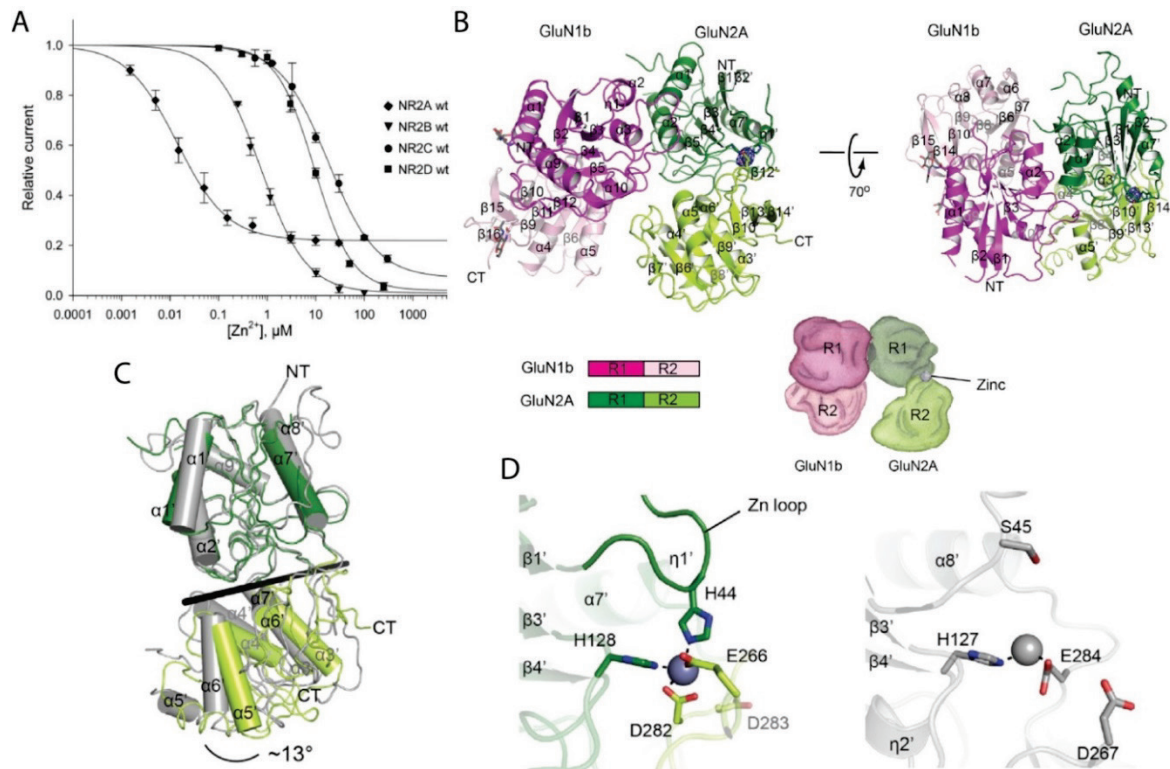
**A-D** Mesure de la différence de probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) entre des récepteurs contenant diverses chimères de sous-unité GluN2A, GluN2B et GluN2D et une sous-unité GluN1 mutée (A652C). Cette mutation permet d'évaluer des différences relatives de probabilité d'ouverture par mesure de l'effet potentiateur du MTSEA qui bloque le pore en conformation ouverte en se liant à la cystéine introduite. On note que l'échange du NTD et de son linker aboutissent à l'échange des propriétés de  $P_o$ . **E** La mesure de la probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) absolue par enregistrement de l'activité unitaire de canaux confirme les résultats macroscopiques. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (Gielen et al. 2009).

#### 1.4.4.1. Modulation par le zinc

L'ion  $Zn^{2+}$  inhibe le récepteur NMDA de façon différente en fonction des sous-unités GluN2 qu'il contient par un mécanisme qui ne dépend pas du potentiel de membrane.

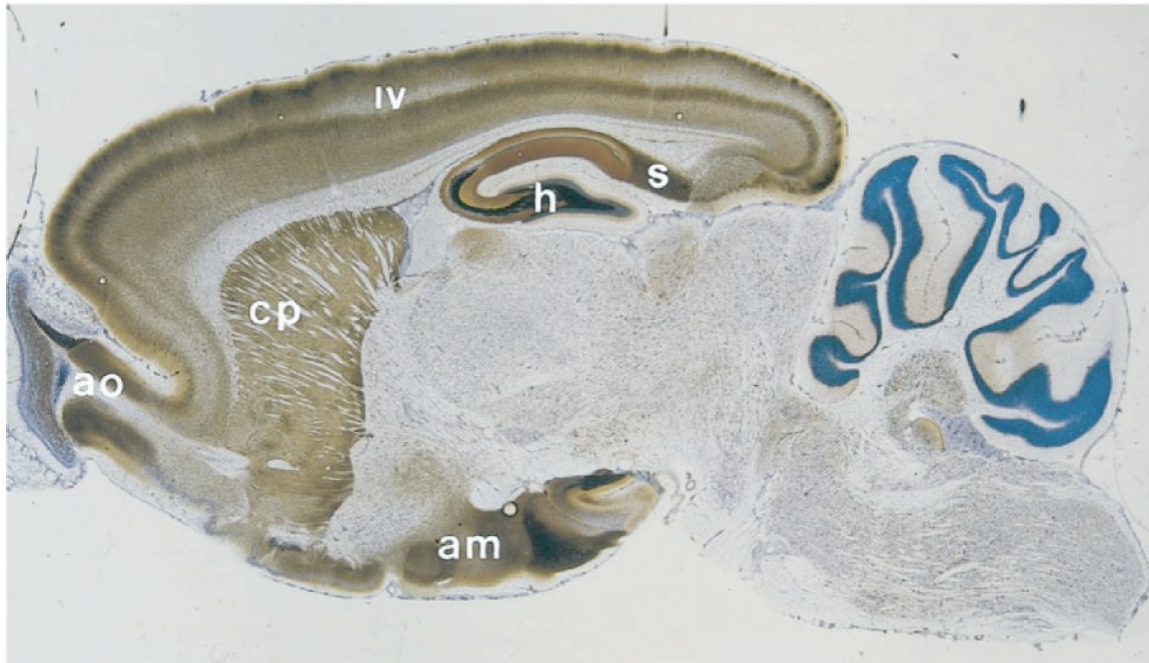
Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A sont les plus sensibles, avec un  $IC_{50}$  de 20 nM (Chen et al. 1997, Paoletti et al. 1997, Traynelis et al. 1998), alors que les dihéromères GluN1/GluN2B présentent une affinité intermédiaire avec un  $IC_{50}$  d'1  $\mu$ M environ (Rachline et al. 2005). La sensibilité au zinc des récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D est environ encore 10 fois plus faible. La plus grande sensibilité au zinc des sous-unités GluN2A et GluN2B est due à la présence d'un site de liaison à haute affinité au niveau de leur NTD (Figure 1.4-8), à présent identifié par cristallographie pour les deux sous-types (Low et al. 2000, Paoletti et al. 2000, Karakas et al. 2009, Romero-Hernandez et al. 2016). Lorsque l'on supprime ce site de liaison à haute affinité, il subsiste une faible sensibilité au zinc, équivalente à celle observée chez GluN2C et GluN2D, liée à un autre mécanisme.

C'est l'obtention de deux structures du NTD GluN2B, l'une liée à l'ion  $Zn^{2+}$ , l'autre non, qui a révélé la conformation particulière twistée du NTD de GluN2 (Figure 1.3-3) et qui a permis d'identifier le site de fixation du zinc avec précision (Karakas et al. 2009). La structure du NTD de GluN2A liée au zinc n'a été obtenue qu'en 2016, confirmant la prédiction d'un twist sur ce 'clamshell' également (Stroebel et al. 2011) et mettant en évidence les points communs et différences entre les deux sites (Romero-Hernandez et al. 2016). Les deux sites de fixation du zinc sont homologues et possèdent la même position au niveau de l'extrémité extérieure de la crevasse interlobe (Figure 1.4-8). Ils stabilisent une forme fermée du NTD, bien que le degré de fermeture ne soit pas le même entre GluN2A et GluN2B : l'angle d'ouverture est supérieur de  $13^\circ$  chez GluN2A. La stabilisation du zinc est liée à sa coordination par 4 acides aminés chez GluN2A, expliquant une affinité très forte (nanomolaire). L'histidine 128 est critique et conservée entre les deux sites et sa mutation détruit le site zinc. Chez GluN2B, l'ion  $Zn^{2+}$  n'est coordonné directement que par 2 acides aminés expliquant la différence d'affinité du zinc entre les deux sous-types. D'autres acides aminés jouent cependant un rôle dans le placement de molécules d'eau autour de l'ion. Il a été montré que le degré d'ouverture des 'clamshells' contrôle l'activité du récepteur. Ainsi, la stabilisation d'une forme ouverte du NTD augmente l'activité du récepteur tandis que le zinc, en se liant à une forme fermée du NTD conduit à une inhibition (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2009a, Zhu et al. 2013).



**Figure 1.4-8 : Le zinc est un modulateur allostérique négatif des récepteurs NMDA.**

**A** Courbes dose-réponse du zinc pour les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D obtenues sur des récepteurs NMDA recombinants exprimés en ovocytes de Xénope à un potentiel de +50 mV pour supprimer l'effet inhibiteur dépendant du potentiel membranaire (voir 1.4.8 ; Rachline et al. 2005). **B** Arrangement du dimère NTD GluN1/GluN2A avec position du site zinc à haute affinité. Le site est localisé en bordure de la crevasse interlobe. **C** Comparaison de l'angle de fermeture du NTD de GluN2A lié au zinc en vert avec l'angle de fermeture du NTD de GluN2B lié au zinc en gris. On constate une différence de 13° environ. Les mouvements d'ouverture et de fermeture de 'clamshell' du NTD sont proposés comme mécanisme de contrôle de l'activité du récepteur. **D** Comparaison entre le site de liaison du zinc de GluN2A à gauche et de GluN2B à droite. Chez GluN2A, l'ion  $Zn^{2+}$  est coordonné par 4 acides aminés, dont un qui provient d'une boucle zinc absente chez GluN2B. Chez GluN2B, le site zinc est homologue, avec deux des 4 acides aminés conservés. L'absence de la boucle zinc et d'un autre résidu aboutit à une coordination par deux acides aminés seulement et explique la différence d'affinité entre les deux sous-types (Karakas et al. 2009, Romero-Hernandez et al. 2016).



**Figure 1.4-9 : Zinc libre dans le cerveau révélé par histochimie.**

Coupe sagittale d'un cerveau de rat après marquage auto-métallographique. Le marquage de marron à noir correspond à la révélation du zinc par la méthode Timm-Danscher. On note une forte présence de zinc dans l'amygdale, le striatum, le cortex et l'hippocampe. Am, amygdale ; ao, bulbe olfactif accessoire ; cp, noyau caudé et putamen ; h, hile du gyrus denté ; s, subiculum (Frederickson et al. 2000, Paoletti et al. 2009).

Le mécanisme qui lie degré d'ouverture des NTD et activité du récepteur n'est pas connu. Cependant, des mutations au niveau de l'interface D1-D1 des dimères d'ABD ont une très forte influence sur la sensibilité zinc des récepteurs GluN1/GluN2A, permettant de l'augmenter d'un facteur 10 et de supprimer le plateau d'inhibition maximale situé à 80% chez le récepteur sauvage (Figure 1.4-8A). En raison du rôle de cette interface dans la désensibilisation des récepteurs AMPA, un mécanisme d'action analogue a été proposé (Gielen et al. 2008).

L'ion  $Zn^{2+}$  a une importance physiologique majeure. En plus d'être un élément essentiel au fonctionnement de nombreuses protéines, est présent dans certains neurones glutamatergiques du système nerveux central (Frederickson et al. 2000, Vogt et al. 2000). Ces neurones sont localisés quasi-exclusivement dans le cerveau antérieur chez



les mammifères (Figure 1.4-9) où ils forment un réseau complexe connectant la plupart des structures corticales et limbiques. Dans ces neurones, le zinc est accumulé dans des vésicules et libéré aux synapses. Cette libération aboutit à une augmentation de la concentration extracellulaire de zinc, inhibant les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A, alors que le niveau basal de zinc est trop faible pour une inhibition tonique de ces récepteurs (Paoletti et al. 2009, Vergnano et al. 2014). Enfin, la différence d'affinité pour le zinc des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, permet de l'utiliser pour inhiber sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A ce qui permet de distinguer ces sous-types de récepteurs en contexte physiologique (Neyton and Paoletti 2006, Bidoret et al. 2009, Papouin et al. 2012).

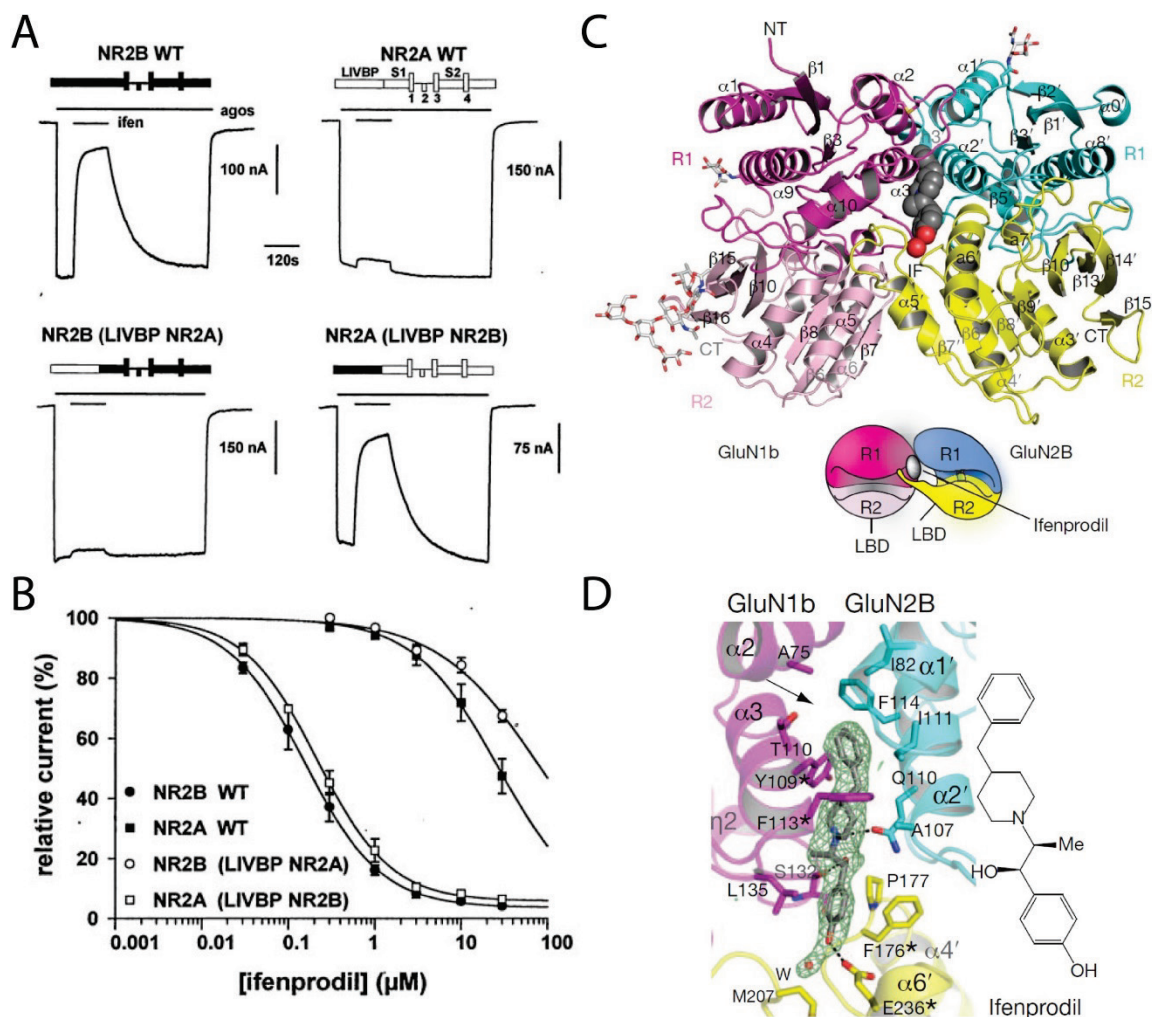
#### ***1.4.4.2. Modulation par l'ifenprodil***

L'ifenprodil est un bon exemple de molécule organique de synthèse qui inhibe sélectivement certains sous-types de récepteurs NMDA : Il agit sur les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B (Legendre and Westbrook 1991, Williams 1993). Son affinité pour ce sous-type de récepteurs est 200 fois supérieure à celle pour les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A ( $IC_{50}$  de 0.16  $\mu$ M contre 28  $\mu$ M ; Perin-Dureau et al. 2002). Comme pour le zinc, l'inhibition ne dépend pas du potentiel membranaire et n'est pas compétitive. Cette sélectivité a suscité un intérêt pharmacologique (Mony et al. 2009a, Koller and Urwyler 2010) et lui vaut d'être utilisé pour l'étude du rôle des différents récepteurs NMDA dans leur contexte physiologique (Neyton and Paoletti 2006, Paoletti and Neyton 2007).

Avant l'obtention d'une structure d'un dimère de NTDs isolés GluN1/GluN2B lié à l'ifenprodil (Karakas et al. 2011), l'idée la plus simple était que le site de liaison serait situé de façon classique dans la crevasse interlobe du NTD de GluN2B (Perin-Dureau et al. 2002, Mony et al. 2009b). Certaines données (constantes d'association à des NTDs isolés par radiomarquage et mutagénèse (Masuko et al. 1999, Han et al. 2008) indiquaient cependant une possible participation de GluN1 au site de liaison. En réalité, si les deux lobes R1 et R2 de GluN2B participent bien au site de liaison, celui-ci n'est cependant pas réellement dans la crevasse interlobe mais à l'interface avec GluN1. Il n'y a d'ailleurs aucun recouvrement entre le site de liaison du zinc et celui de l'ifenprodil. Du

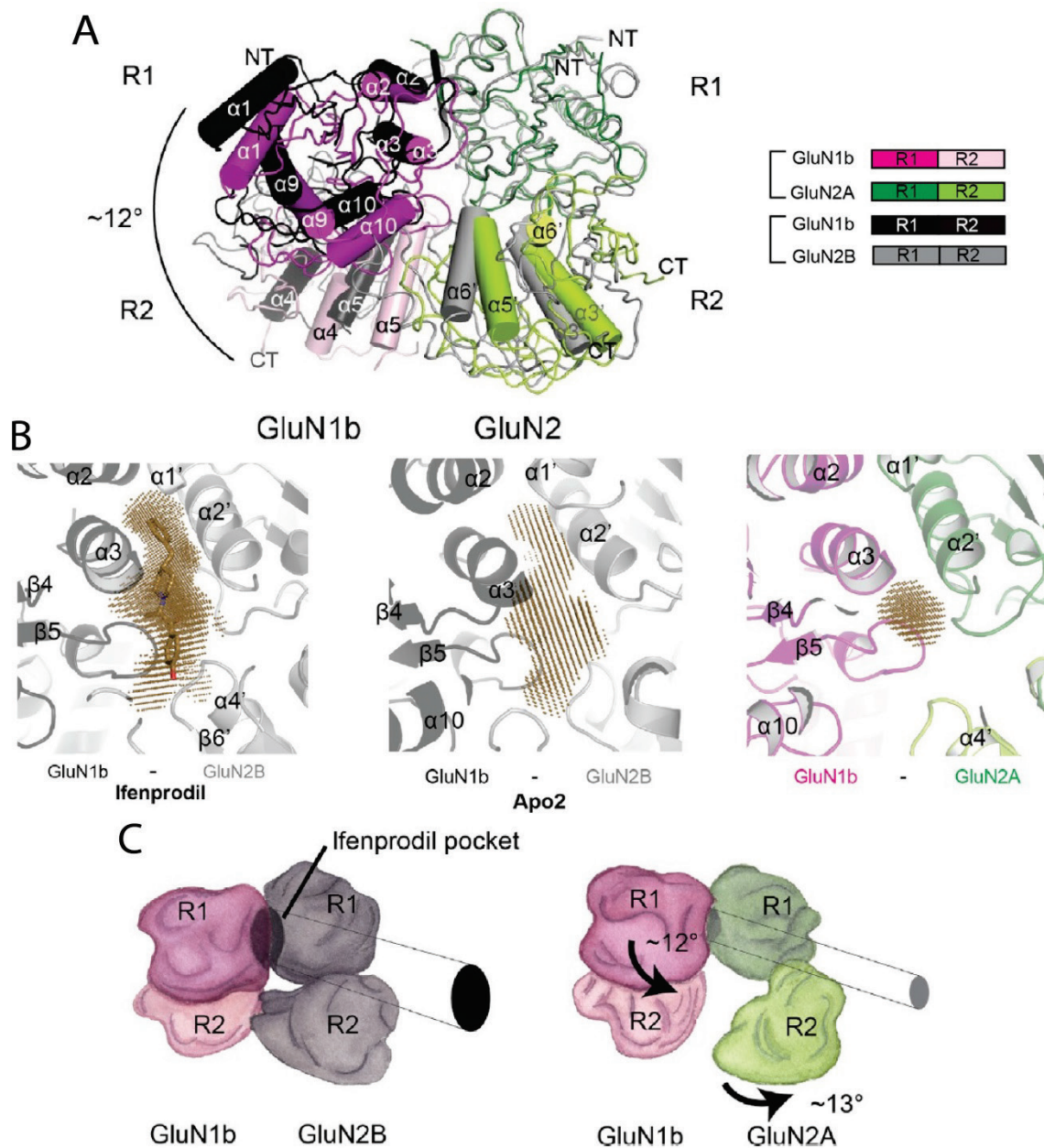
fait de la conformation twistée du NTD GluN2B, la fermeture de son lobe du bas sur l'interface de dimérisation crée une véritable poche de liaison. Dans la structure, la molécule est enfouie dans le dimère de NTD et n'a pas suffisamment d'espace pour entrer ou sortir de sa poche ce qui implique que des réarrangements NTD sont nécessaires pour permettre à la molécule de se lier (Figure 1.4-10).

L'arrangement dimérique GluN1/GluN2B est légèrement distinct de celui de GluN1/GluN2A (Romero-Hernandez et al. 2016). Dans les deux cas, l'interface de dimérisation est principalement située entre les deux lobes du haut (R1-R1) ce qui est caractéristique des NTDs de récepteurs NMDA. Cependant, le NTD de GluN2B est plus fermé (13° de différence) et son lobe du bas participe aussi à la dimérisation. Cette fermeture plus importante est permise par une rotation en corps rigide de 12° du domaine de GluN1 relativement à GluN2 (Figure 1.4-11). Ces différences rendent compte de l'absence de la poche ifenprodil chez GluN2A (Karakas et al. 2011, Romero-Hernandez et al. 2016), expliquant ainsi la très forte sélectivité de cette molécule pour les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B comparé à ceux contenant GluN2A. Le fait que l'ifenprodil qui est un inhibiteur stabilise, tout comme le zinc, une forme fermée du NTD confirme la théorie selon laquelle une forme fermée du NTD de GluN2 est associée à un état peu actif du récepteur (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2009a, Zhu et al. 2013). Enfin, l'ifenprodil (ou un équivalent, le Ro25-6981) est présent sur la plupart des structures de récepteur NMDA entier, probablement car il permet d'en faciliter la cristallisation. Ainsi, plusieurs structures quasi-complètes du récepteur NMDA liées à cet inhibiteur sont disponibles (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014, Lu et al. 2017, Regan et al. 2018).



**Figure 1.4-10 : Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B sont sensibles à l'ifenprodil grâce à leur NTD.**

**A** Traces de courant de récepteurs NMDA sauvages et mutants montrant la sensibilité à l'ifenprodil pendant l'application continue d'agoniste. Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B sont inhibés par 1 μM d'ifenprodil mais pas les récepteurs GluN1/GluN2A. Une inversion des NTDs des deux sous-unités aboutit cependant à la situation inverse montrant le rôle de ce domaine dans la sélectivité. **B** Courbes dose réponse de l'inhibition par l'ifenprodil des récepteurs NMDA sauvages et mutants présentés en A. L'IC<sub>50</sub> de l'inhibition ifenprodil est de 150 nM pour GluN1/GluN2B et de 28 μM pour GluN1/GluN2A. L'échange des NTDs aboutit à une permutation presque exacte de ces deux valeurs. **C** Structure de l'hétérodimère de NTD GluN1b-GluN2B en présence de l'ifenprodil. L'ifenprodil est enfoui à l'interface entre les deux domaines, avec une forte participation du lobe du bas de GluN2B à la poche (en jaune). **D** Détail de la poche de liaison et représentation topologique de l'ifenprodil. La liaison de l'ifenprodil est permise par des interactions hydrophobes avec le groupement benzylpiperidine et le groupement hydroxylphenyl qui sont à chaque extrémité de la molécule et par trois interactions polaires directes (Perin-Dureau et al. 2002, Karakas et al. 2011).



**Figure 1.4-11: Comparaison de l'arrangement des dimères de NTD GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B.**

**A** Superposition de l'hétérodimère GluN1/GluN2A lié au zinc et de l'hétérodimère GluN1/GluN2B lié à l'ifenprodil par alignement du lobe R1 de GluN2. On note une rotation de 12° de GluN1 entre les deux arrangements dont l'axe est représenté par une barre noire. Le NTD de GluN2A est en vert, celui de GluN2B en gris. Le NTD de GluN1 est en violet (R1) et blanc (R2) au sein du dimère GluN1/GluN2A et en noir (R1) et gris foncé (R2) au sein de GluN1/GluN2B. **B** La différence d'arrangement hétérodimérique aboutit à l'absence de poche ifenprodil chez le dimère de NTD GluN1/GluN2A alors que celle-ci est bien présente chez GluN1/GluN2B, que le ligand soit présent ou non (Apo2). **C** Modèles représentant les deux arrangements dimériques avec la position de la poche ifenprodil. La différence de fermeture du NTD GluN2 et d'arrangement dimérique sont représentées sur le modèle GluN1/GluN2A (Romero-Hernandez et al. 2016).

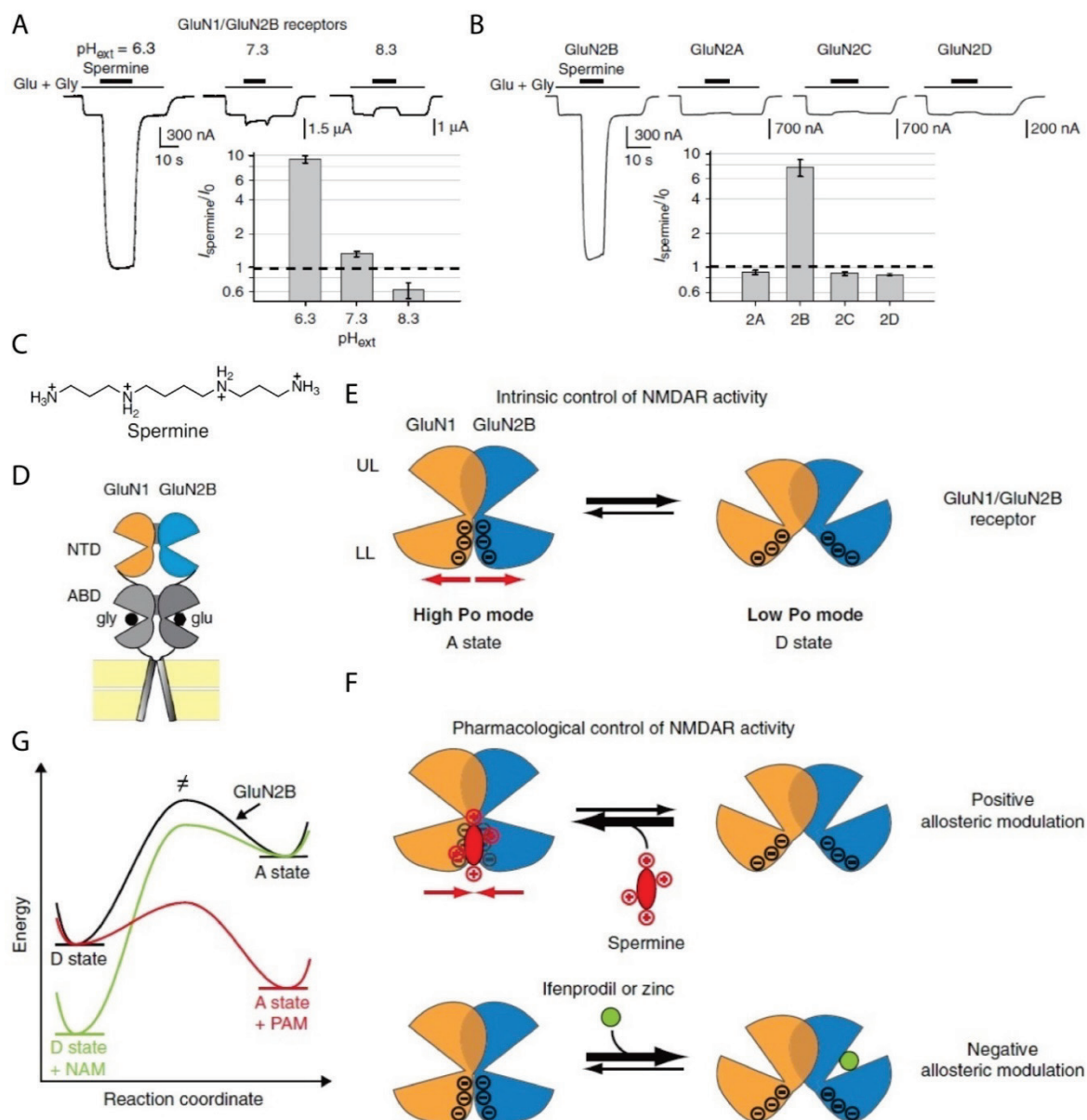
### ***1.4.4.3. Modulation par les polyamines***

Les polyamines sont des molécules endogènes, qui augmentent sélectivement l'activité des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Williams et al. 1994, Zhang et al. 1994). Ces modulateurs allostériques positifs, dont les représentants les plus connus sont la spermine et la spermidine, sont naturellement présents dans l'organisme (Igarashi and Kashiwagi 2010). Ils peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire, et agissent également sur les canaux calciques. Au niveau des récepteurs NMDA, leur effet est multiple (Mony et al. 2009a) : il comprend un blocage du pore dépendant du voltage, une augmentation de l'affinité apparente pour la glycine et une potentiation indépendante du voltage et de la glycine qui passe par une diminution de l'effet inhibiteur tonique des protons (Figure 1.4-12). Ce dernier effet est spécifique aux récepteurs contenant la sous-unité GluN2B, mais son amplitude est moins grande lorsqu'elle est associée à la sous-unité GluN1b contenant l'exon 5 qu'avec la sous-unité GluN1a où celui-ci n'est pas présent (McGurk et al. 1990, Lerma 1992, Rock and MacDonald 1992, Zhang et al. 1994, Rock and Macdonald 1995, Williams 1997, Mott et al. 2003).

De nombreuses mutations affectant la sensibilité à la spermine ont été décrites, (Williams et al. 1995, Kashiwagi et al. 1996, Gallagher et al. 1997, Masuko et al. 1999) réparties sur toute la séquence des sous-unités GluN1 et GluN2, avant que le site de liaison spécifique des polyamines ne soit identifié. En effet, ces mutations affectent pour la plupart la sensibilité du récepteur à l'inhibition par les protons, elle-même affectée par la liaison de la spermine et il faut donc distinguer les effets liés directement à une altération du site de liaison des effets qui diminuent la sensibilité au pH et donc indirectement l'effet de la spermine. Après des études suggérant un site de liaison au niveau NTD ou au niveau ABD (Stoll et al. 2007, Han et al. 2008), ce dernier a finalement été identifié à l'interface entre les lobes du bas des dimères de NTD R2-R2 (Mony et al. 2011).

Les NTDs de GluN1 et GluN2 s'associent en dimères principalement par leurs lobes du haut (R1). Le dimère de NTD GluN1/GluN2 a donc ses deux lobes du bas R2 relativement libres de mouvement (Figure 1.3-3 et Figure 1.4-4 ; Karakas et al. 2009). Il peut adopter

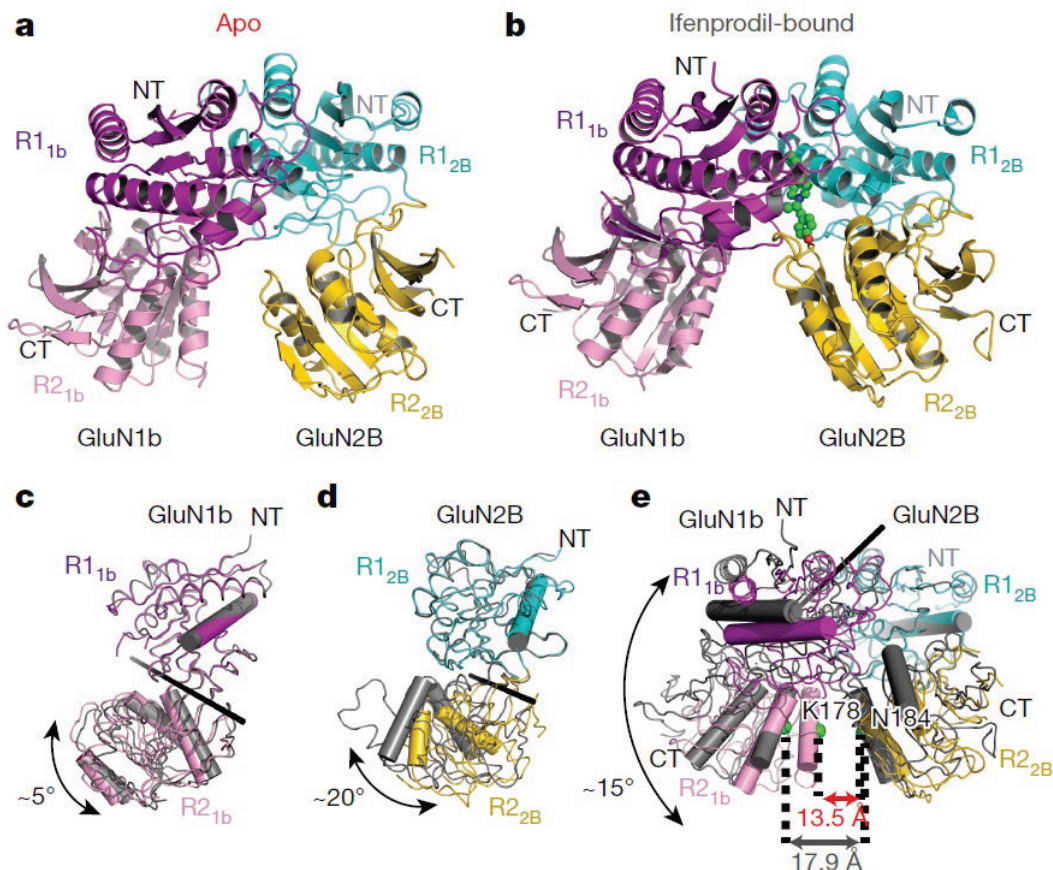
différentes conformations, modifiant la proximité des lobes du bas en fonction de l'arrangement dimérique (dont dépend la présence de la poche ifenprodil) et du degré de fermeture et de twist des domaines bilobés (voir par exemple Figure 1.4-11 et Figure 1.4-13). L'arrière de ces lobes du bas est une zone qui comporte un grand nombre de charges négatives chez GluN2B, favorisant une répulsion électrostatique et donc une forme plus fermée des 'clamshells' associée à un récepteur inhibé (Figure 1.4-12). C'est au niveau de ces charges, entre les deux lobes, que se lie la spermine, permettant de les masquer et de stabiliser une conformation active des NTDs (Mony et al. 2011). La forte composante électrostatique de la fixation est confirmée par la capacité des ions magnésium  $Mg^{2+}$  à potentialiser les récepteurs GluN1/GluN2B au niveau du même site (Paoletti et al. 1995). En revanche, plusieurs des charges négatives situées dans la région  $\beta 6$ - $\beta 8$  de GluN2B ne sont pas présentes chez GluN2A ce qui explique à la fois la sélectivité de la spermine pour les récepteurs contenant GluN2B et la plus forte probabilité d'ouverture basale des récepteurs contenant GluN2A (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2011). Ce modèle de modulation allostérique par les NTDs a l'avantage d'unifier l'action des différents PAM et NAM qui agissent au niveau de cette couche du récepteur en un seul mécanisme local. Il permet d'expliquer l'interaction négative qui existe entre les polyamines et le zinc (Traynelis et al. 1998). Il a été renforcé récemment par la parution d'une structure d'hétérodimère de NTD GluN1/GluN2B en conformation active (Figure 1.4-13), retrouvée au sein d'un récepteur entier (Tajima et al. 2016). En revanche, la façon dont la conformation du dimère de NTD, stabilisée ou non par un modulateur, influe sur la machinerie d'ouverture pour régler l'activité du récepteur n'est pas élucidée.



**Figure 1.4-12 : La spermine, modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA.**

**A** La potentiation des récepteurs NMDA passe par une diminution de l'inhibition tonique par les protons. L'effet est donc beaucoup plus fort à pH acide. On note à pH 8.3 le modeste effet inhibiteur de la spermine qui passe par le blocage du pore (les enregistrements sont réalisés à -60 mV). **B** La potentiation spermine est spécifique des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. **C** Formule topologique de la spermine. **D** Vue schématique d'un récepteur NMDA, seul un hétérodimère est représenté, faisant abstraction du 'domain swapping'. Le NTD de GluN1 est en orange, celui de GluN2B est en bleu. **E** Contrôle intrinsèque de l'activité des récepteurs NMDA par les NTD : Le dimère NTD GluN1/GluN2B oscille spontanément entre la conformation A avec des domaines ouverts dont les lobes du bas sont proches l'un de l'autre favorisant un état actif du récepteur, et la conformation D, où les domaines sont fermés et les lobes du bas sont

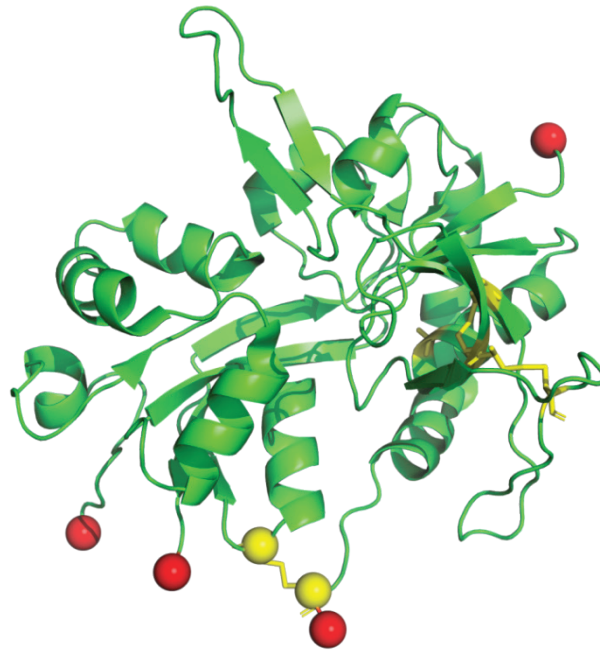
éloignés l'un de l'autre favorisant un état inactif. **F** Contrôle pharmacologique de l'activité des récepteurs NMDA. Les Polyamines comme la spermine masquent les charges négatives des lobes R2 de l'interface du dimère NTD et remplacent la répulsion électrostatique par une attraction, stabilisant la conformation A. Les modulateurs allostériques négatifs en revanche favorisent la fermeture des NTD et l'éloignement des lobes R2 l'un de l'autre stabilisant l'état D à faible probabilité d'ouverture. **G** Diagramme énergétique correspondant aux états A et D en présence ou en absence de modulateur allostérique positif ou négatif chez le récepteur NMDA GluN1/GluN2B.



**Figure 1.4-13 : Conformation active du dimère de NTD chez le récepteur NMDA.**

Structure cristallographique de l'hétérodimère de NTD GluN1-b/GluN2B dans sa forme active en **A** et dans sa conformation liée à l'ifenprodil en **B**. Les lobes R1 et R2 sont en magenta et rose pour GluN1-b et cyan et jaune pour GluN2B. L'ifenprodil est représenté par des sphères vertes. **C-D**. Superposition des NTDs isolés de GluN1-b (**C**) et GluN2B (**D**) dans chaque conformation en alignant des lobes du haut (R1). La forme liée à l'ifenprodil est en gris. On note les différences d'ouverture des 'clamshells'. **E** L'alignement des deux structure révèle une rotation de 15° d'un domaine par rapport à l'autre (autour d'un axe représenté en noir) et une distance différente entre les lobes du bas liée à cette rotation et aux différences d'angle d'ouverture des domaines (Tajima et al. 2016).





**Figure 1.4-14 : Site de modulation des récepteurs NMDA par le potentiel d'oxydoréduction.**

Représentation en cartoon du domaine ABD de GluN1 avec les cystéines présentées en jaune (PDB 4TLL). Les deux cystéines dont le carbone alpha est représenté par une sphère sont les deux acides aminés responsables de la sensibilité des récepteurs NMDA à l'oxydoréduction. Les sphères rouges correspondent au départ des linkers vers les domaines voisins (un départ vers le NTD en haut et 3 linkers qui relient à l'ABD en bas). On note que le pont cystéine entre C744A et C798A est à proximité directe du linker qui relie l'ABD à l'hélice transmembranaire TM4 (Lee et al. 2014).

### 1.4.5. Modulation par le potentiel d'oxydo-réduction

Les récepteurs NMDA sont modulés par le potentiel d'oxydo-réduction extracellulaire ambiant (Aizenman et al. 1989, Aizenman et al. 1990, Kohr et al. 1994). Cette modulation ne fait pas intervenir un modulateur particulier mais elle est liée à un site bien défini, allostérique car distinct du site orthostérique de liaison de l'agoniste. Cette sensibilité est contrôlée par deux cystéines de la sous-unité GluN1, C744 et C798 qui forment ensemble un pont disulfure (Sullivan et al. 1994). Ce dernier est localisé dans le bas du domaine de liaison de l'agoniste (Figure 1.4-14). Les composés réducteurs,

comme le dithioerythritol (DTE) ou dithiothreitol (DTT), permettent par réduction de ce pont disulfure, d'augmenter l'activité des récepteurs GluN1/GluN2B sauvages d'un facteur 2 et dans une moindre mesure celles des récepteurs GluN1/GluN2A. Cette action est réversible, et l'utilisation d'agents oxydants comme le DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) ou réactif d'Ellman) diminuent l'activité du récepteur par réformation du pont disulfure. Le remplacement des deux cystéines par des alanines par mutagenèse dirigée aboutit à des récepteurs constitutivement plus actifs et insensibles à la modulation.

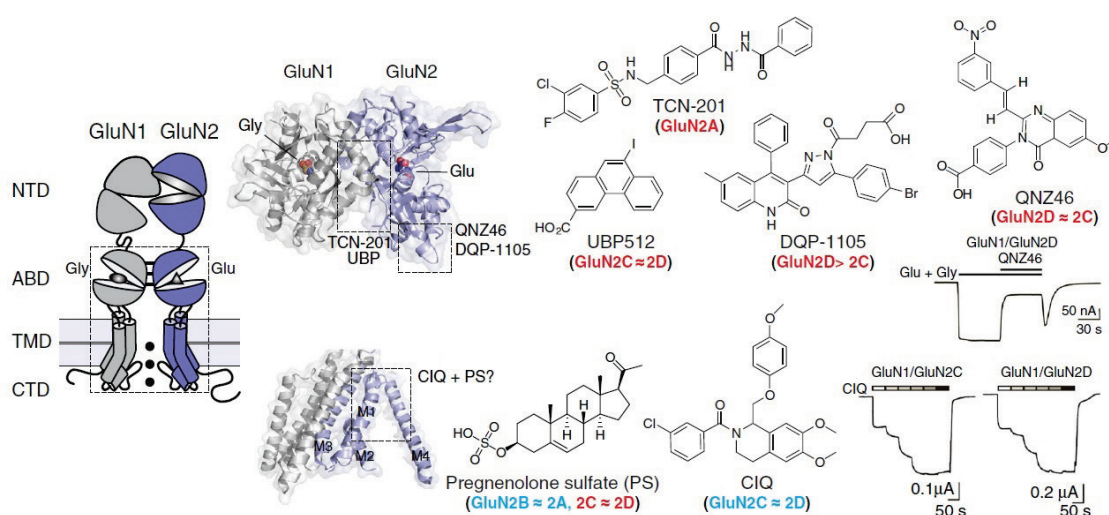
### **1.4.6. Modulateurs agissant au niveau de l'ABD**

La découverte de modulateurs allostériques ciblant la couche ABD est récente chez les récepteurs NMDA. Les premiers ont été identifiés en 2010 avec la découverte d'une série de composés dont le TCN-201 est le chef de file (Bettini et al. 2010). Ces molécules sont des modulateurs allostériques négatifs particulièrement sélectifs pour la sous-unité GluN2A, et dont le mode d'action est unique. Leur effet est directement lié au taux d'occupation des ABDs de la sous-unité GluN1, qui lie la glycine ou la D-sérine. Cependant, même si une forte concentration en glycine vient à bout de l'inhibition par le TCN, les deux molécules ne sont pas en compétition pour le même site de liaison (Edman et al. 2012, Hansen et al. 2012). Le mécanisme d'inhibition est donc bien un mécanisme allostérique : en se fixant au sein de l'interface des dimères d'ABD GluN1/GluN2A (Figure 1.4-15), le TCN-201 accélère la constante de dissociation de la glycine. Ce modulateur allostérique négatif a déjà été utilisé pour contrôler la composition des récepteurs NMDA dans des neurones en culture malgré sa faible solubilité (McKay et al. 2012, Zhu and Paoletti 2015).

Plus récemment, des potentiateurs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A ont été trouvés (Hackos et al. 2016, Hackos and Hanson 2017). Appartenant à une nouvelle classe de composés, ces molécules de synthèse dénommées GNE-3476, GNE-3419, GNE-6901 et GNE-8324 agissent également au niveau d'un site de liaison situé au sein de l'interface des dimères d'ABD (Figure 1.4-16). Pour ces composés, le site de fixation est connu plus précisément, il est situé à l'interface entre les lobes du haut.

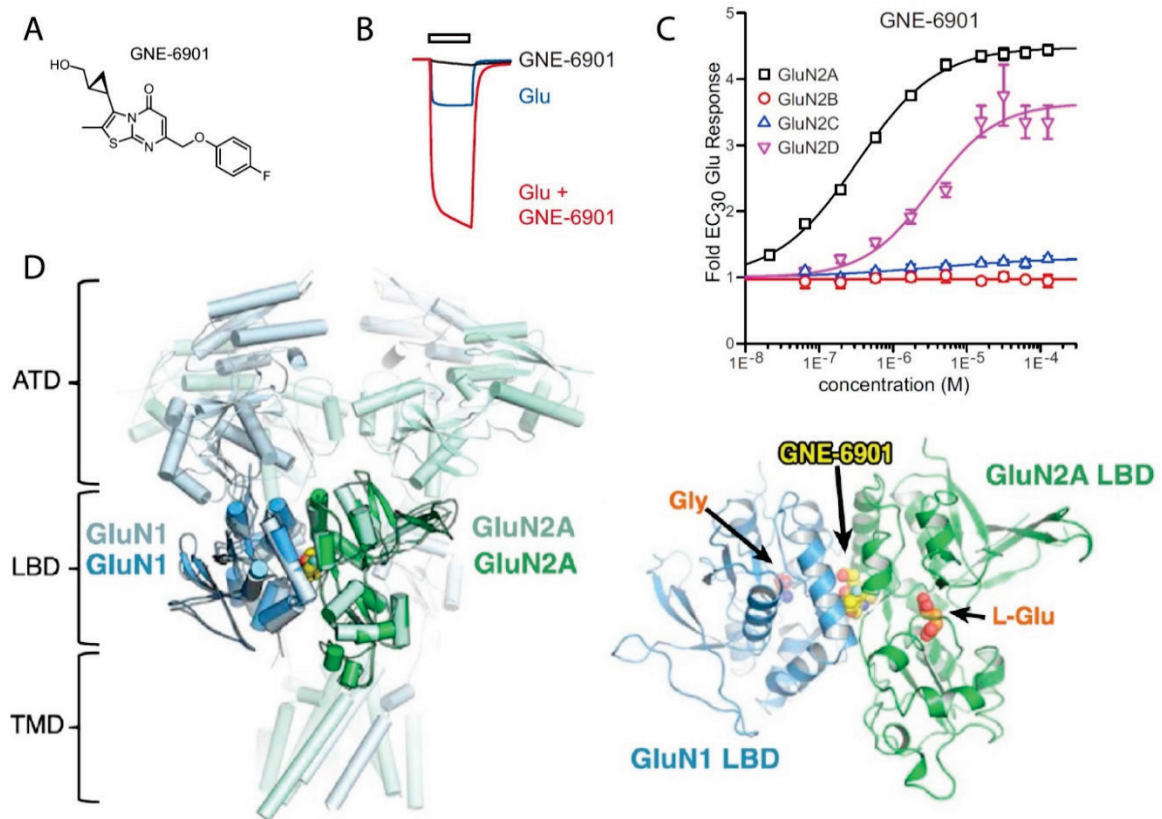
Des molécules agissant à une position homologue et bloquant la désensibilisation comme le cyclothiazide étaient déjà connues chez les récepteurs AMPA (Sun et al. 2002) mais pas chez le récepteur NMDA. De façon inattendue, il semble qu'un composé de la même famille se lie au niveau de la zone transmembranaire, suggérant un nouveau potentiel pour cette région dans la recherche de molécules thérapeutiques (Wang et al. 2017).

Des inhibiteurs ciblant les sous-unités GluN2C et GluN2D ont également été identifiés. Leur principal représentant est dénommé QNZ46. Une étude électrophysiologique détaillée a montré que l'action de ces molécules est dépendante de la liaison du glutamate à la sous-unité GluN2 et a permis de situer approximativement leur site de fixation au niveau du lobe inférieur de l'ABD de GluN2D (Figure 1.4-15), dans une zone proche de la membrane (Mosley et al. 2010, Hansen and Traynelis 2011). Par ailleurs, d'autres inhibiteurs sélectifs des sous-unités GluN2C et GluN2D sans rapport structural avec le QNZ46, tel le DPQ-1105, semblent partager le même site de fixation (Acker et al. 2011).



**Figure 1.4-15 : Modulateurs allostériques des récepteurs NMDA agissant au niveau de la machinerie d'activation (ABD et TMD).**

À gauche, une représentation schématique du récepteur NMDA, seul un dimère est représenté, permettant de situer l'ABD et le TMD. Le site d'action probable des composés présentés en formule topologique à droite est situé sur les structures d'un dimère d'ABD et de TMD. La sélectivité est indiquée pour chaque composé, en rouge si c'est un inhibiteur, en bleu si c'est un potentiateur (Zhu and Paoletti 2015).



**Figure 1.4-16 : GNE-6901, un modulateur allostérique positif des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A agissant au niveau de l'ABD.**

**A** Formule topologique du GNE-6901. **B** Trace représentative de l'effet de 30 µM du modulateur sur des récepteurs NMDA GluN1/GluN2A exprimés en ovocytes de Xénope et activés ou non par 100 µM de glutamate. **C** Facteur de potentiation de la réponse à l'EC<sub>30</sub> du glutamate en fonction de la concentration de GNE-6901 utilisée pour les différents sous-types de récepteurs du glutamate. Le composé est sélectif des récepteurs GluN1/GluN2A mais agit également sur les récepteurs GluN1/GluN2D. **D** Le site de liaison du PAM se situe à l'interface de dimérisation ABD. C'est à ce niveau que se fixent les composés qui empêchent la désensibilisation des récepteurs AMPA. Chez les récepteurs NMDA, il a été montré que cette région est importante dans la sensibilité aux protons et au zinc. (Gielen et al. 2008, Hackos et al. 2016).

### 1.4.7. Autres modulateurs allostériques

Les récepteurs NMDA sont modulés par des neurostéroïdes, les neurostéroïdes sulfatés insaturés étant des potentiateurs tandis que les neurostéroïdes saturés inhibent le

récepteur (Weaver et al. 2000). Cette modulation est dépendante du sous-type de récepteur mais le mécanisme d'action n'a pas été établi (Horak et al. 2004, Jang et al. 2004, Horak et al. 2006, Stoll et al. 2007, Kussius et al. 2009).

Les récepteurs NMDA sont également régulés positivement par des interactions directes avec les acides gras polyinsaturés comme l'acide arachidonique ou l'acide oléique (Miller et al. 1992, Casado and Ascher 1998). Le site de liaison de ces composés n'est pas connu. Une simulation de dynamique moléculaire récente a cependant suggéré que les lipides pouvaient interagir avec une interface située entre les hélices TM2 et TM3 de GluN1 et l'hélice TM3 de la sous-unité GluN2B adjacente (Song et al. 2018).

Par ailleurs, les récepteurs NMDA sont mécano-sensibles, c'est-à-dire sensibles à la pression osmotique et à la tension membranaire (Paoletti and Ascher 1994, Casado and Ascher 1998).

Plus récemment, des modulateurs allostériques positifs des récepteurs NMDA ont été identifiés. Le composé PYD-106 est sélectif des récepteur GluN1/GluN2C et se lie à l'interface entre ABD et NTD sur GluN2C (Khatri et al. 2014, Zimmerman et al. 2014). Les tetrahydroisoquinolines comme le CIQ ciblent les récepteurs GluN2C et GluN2D (Mullasseril et al. 2010, Ogden and Traynelis 2013). La famille des composés UBP sont des modulateurs à la sélectivité variable entre les différents sous-types de récepteurs NMDA, parfois potentiateurs et parfois inhibiteurs. Leur site d'action n'est pas connu précisément (Costa et al. 2010, Irvine et al. 2012).

Enfin, de nouveaux inhibiteurs ciblant les sous-unités GluN2C et GluN2D et se liant au niveau du domaine transmembranaire ont été trouvés en 2017. NAB-14 est leur principal représentant (Swanger et al. 2018).

### **1.4.8. Les bloqueurs du pore**

En grande partie du fait de la présence d'une asparagine au niveau du site Q/R/N (voir 1.3.5), les propriétés du pore des récepteurs NMDA sont différentes de celles des autres récepteurs-canaux du glutamate. Le canal des récepteurs NMDA est en effet perméable

au calcium, et peut être bloqué par de nombreuses petites molécules comme les ions  $Mg^{2+}$  et  $Zn^{2+}$ , les polyamines ou des composés de synthèse, avec généralement une forte dépendance au voltage (Traynelis et al. 2010, Wollmuth 2018). Des différences existent cependant entre les différents sous-types de récepteurs NMDA en termes de blocage magnésium, de conductance unitaire et de perméation calcique. Les récepteurs NMDA contenant les sous-unités 2A et 2B ont une conductance unitaire plus forte, une perméabilité calcique 2 fois plus importante et une plus grande affinité pour le magnésium que les récepteurs contenant les sous-unités 2C et 2D (Stern et al. 1992, Stern et al. 1994, Cull-Candy and Leszkiewicz 2004). Cette différence est en grande partie liée à un acide aminé au niveau d'un site dit S/L sur l'hélice TM3 de GluN2 (position 632 sur 2A ; Siegler Retchless et al. 2012).

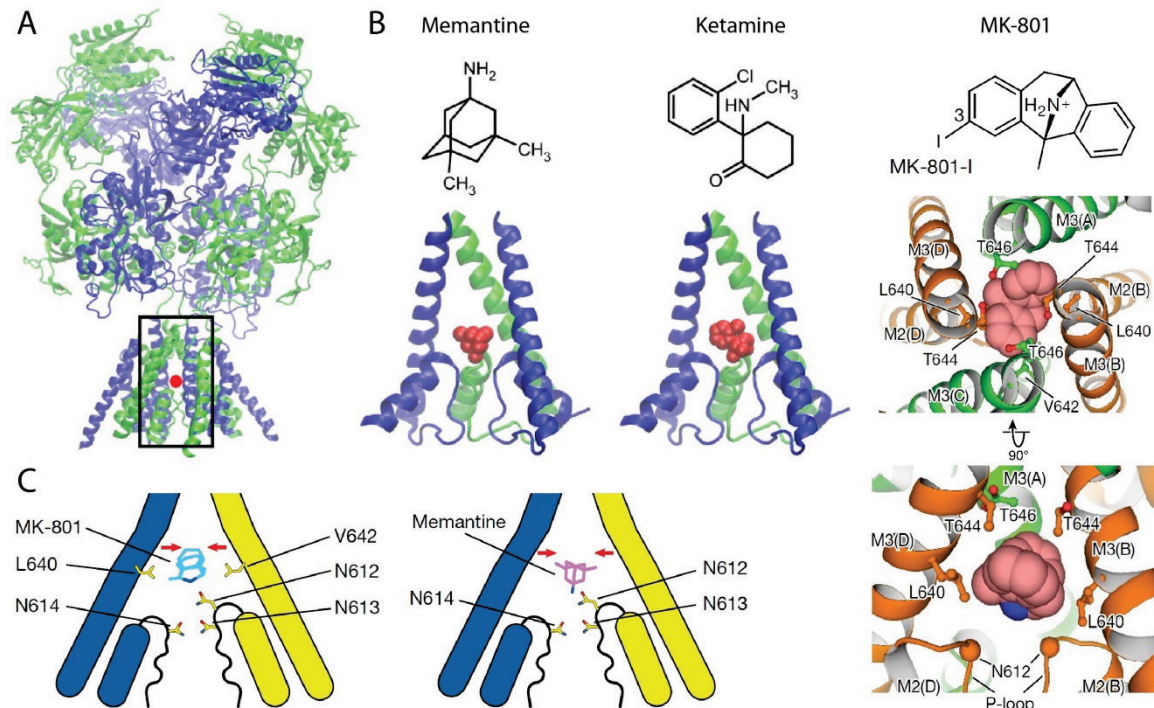
Les ions  $Mg^{2+}$  sont des modulateurs cruciaux en contexte physiologique car ils sont responsables de la forte dépendance au voltage de la conductance des récepteurs NMDA à la synapse. C'est grâce au blocage du pore par le magnésium que les récepteurs NMDA jouent leur rôle de détecteur de coïncidence (Figure 1.2-6), décelant lorsque la dépolarisation post-synaptique se produit au même moment ou peu après la libération du glutamate (Mayer et al. 1984, Nowak et al. 1984, Ascher et al. 1988). Le site de liaison du magnésium est situé environ à mi-chemin dans la membrane, dans une zone du pore plus large appelée vestibule interne, située entre les deux points de constriction qui sont la porte d'activation ('gate') qui contrôle l'ouverture du canal et le filtre de sélectivité (Villarroel et al. 1995, Zarei and Dani 1995).

Le blocage du pore par les ions  $Zn^{2+}$  passe par un mécanisme similaire. L'action du zinc au niveau du pore est de relativement faible affinité ( $IC_{50}$  d'environ 10  $\mu M$  ; Paoletti et al. 1997) et est rapidement réversible. Les polyamines comme la spermine et la spermidine, qui sont des molécules endogènes, interagissent au niveau du pore avec différents résidus de l'hélice réentrante TM2, y compris au niveau du site Q/R/N. Elles peuvent ressortir du canal à la fois côté intérieur et côté extérieur et donc traverser le canal (Bowie and Mayer 1995, Bowie et al. 1998, Dingledine et al. 1999). Lors de l'étude de l'effet potentiateur des polyamines et de l'effet inhibiteur du zinc au niveau des NTDs, on peut se placer à un potentiel membranaire faible pour éviter l'effet de blocage du pore de ces molécules qui dépend du voltage appliqué.

La mémantine est un médicament utilisé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (Johnson et al. 2015). La kétamine, dont le mode d'action est similaire, a des effets bénéfiques dans le traitement de la douleur et de la dépression. Ces deux molécules sont des bloqueurs du pore (Figure 1.4-17) qui agissent également en occluant le canal au niveau du vestibule interne, empêchant le passage des ions. Comme les autres bloqueurs du pore, elles ne peuvent donc pas agir quand le récepteur est inactif. De plus, elles présentent aussi une forte dépendance au voltage, avec une inhibition plus efficace quand la membrane est hyperpolarisée. Le site d'action de ces deux composés chevauche celui du magnésium, ce qui explique que la présence d'une concentration physiologique de  $Mg^{2+}$  (1 mM) décale leur  $IC_{50}$ . La mémantine est une drogue bien tolérée et autorisée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer tandis que la kétamine, malgré des effets antidépresseurs rapides, reproduit les symptômes de la schizophrénie (Wilkinson 2012, Wilkinson et al. 2014). La différence d'action entre ces deux molécules n'est pas encore bien comprise mais il semblerait qu'elles inhibent des sous-populations de récepteurs NMDA distinctes (Johnson et al. 2015, Glasgow et al. 2017)

Enfin le mécanisme du MK-801 (ou dizocilpine), qui est une molécule de synthèse aux propriétés neuroprotectrices dans des modèles animaux d'accident vasculaire cérébral, de trauma crânien et de maladie de Parkinsons (Kovacic and Somanathan 2010), passe également par un blocage du pore. Ses effets secondaires, probablement liés à sa forte affinité et son long temps de séjour dans le canal, empêchent cependant son utilisation thérapeutique. Sa propriété de blocage lent, effective uniquement lorsque le récepteur est actif (la molécule ne peut pénétrer dans le pore pour le bloquer que s'il est ouvert) a conduit à son utilisation pour évaluer la probabilité d'ouverture du récepteur sur des courants macroscopiques. En effet, la cinétique de son effet inhibiteur, révélatrice de sa liaison au niveau du pore, est reliée à la proportion de canaux ouverts et donc à la probabilité d'ouverture du récepteur. Le MK-801 inhibera plus rapidement des canaux ouverts 90% du temps que des canaux ouverts 10% du temps ce qui permet d'estimer une probabilité d'ouverture relative entre différentes populations de récepteurs (Huettner and Bean 1988, Jahr 1992, Rosenmund et al. 1993, Hansen et al. 2013). Tout récemment, la suppression des domaines NTD du récepteur NMDA pour améliorer sa

crystallisation a permis d'obtenir des détails moléculaires de l'intérieur du pore au sein du domaine transmembranaire, et de mieux comprendre la fixation du MK-801 et de la mémantine (voir aussi 1.6.2.3 ; Song et al. 2018).



**Figure 1.4-17 : Mécanisme de blocage du pore chez le récepteur NMDA.**

**A** Structure du récepteur NMDA entier (GluN1 en vert, GluN2B en bleu) montrant par un point rouge le vestibule interne, emplacement du blocage du pore. **B** En haut, formule topologique de trois bloqueurs du pore synthétiques. La kétamine possédant deux énantiomères, elle est ici représentée sans chiralité. En bas, positionnement de la mémantine et de la kétamine dans un modèle par homologie du pore de GluN1/GluN2A (Siegler Retchless et al. 2012) et positionnement du MK-801 dans une structure de récepteur GluN1-GluN2B, (vue extracellulaire et latérale ; Song et al. 2018). **C** Représentation schématique des sites de liaison de la mémantine et du MK-801. GluN1 est en bleu et GluN2B est en jaune. Les deux bloqueurs provoquent la fermeture du pore et se positionnent par des interactions similaires avec les résidus asparagine clés, dont GluN1-N614 et GluN2B-N612 qui correspondent au site Q/R/N (Voir 1.3.5) (Johnson et al. 2015, Song et al. 2018).



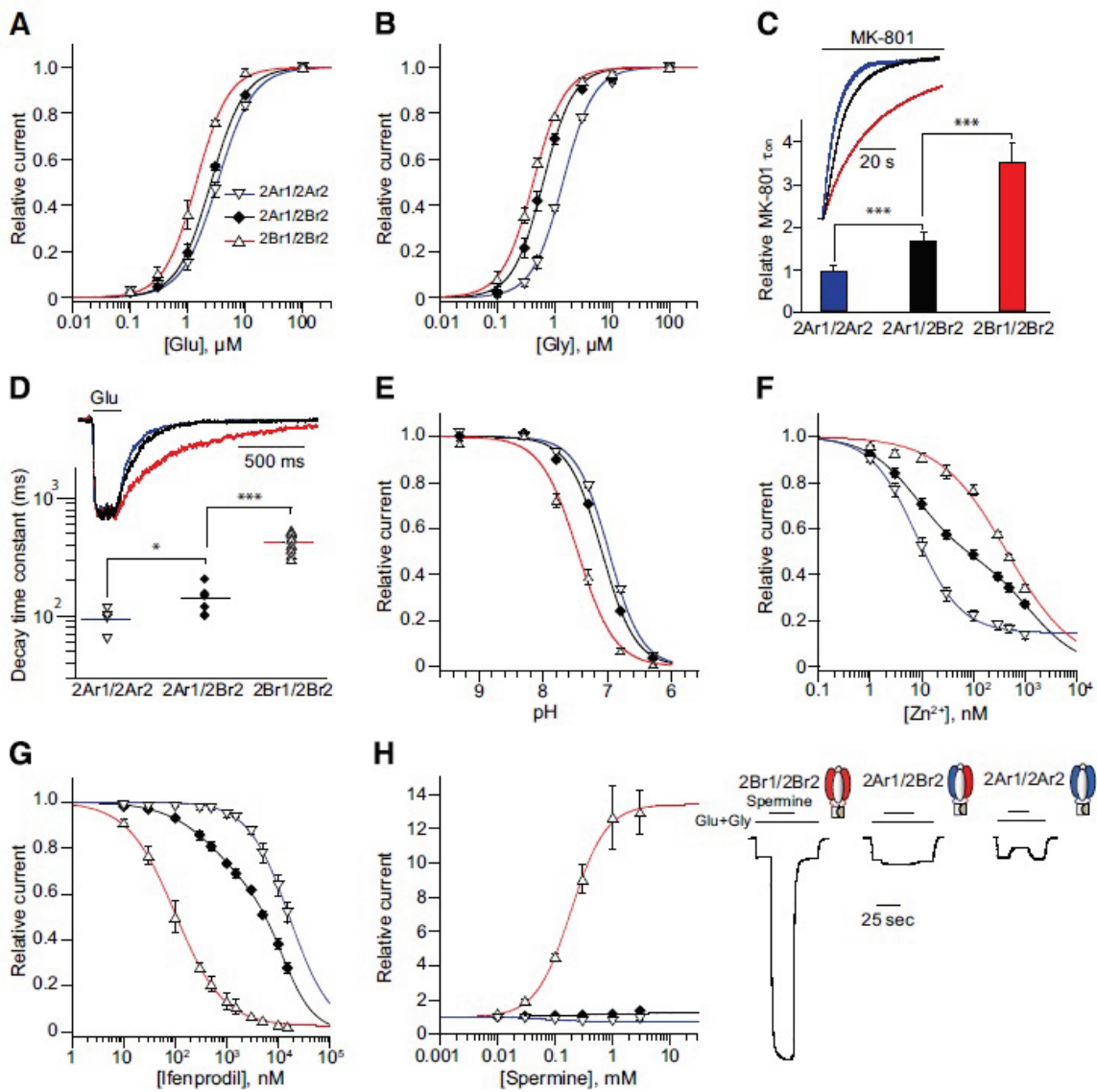
### 1.4.9. Pharmacologie des récepteurs trihétéromériques

La caractérisation des différents modulateurs allostériques du récepteur NMDA a généralement été faite *in vitro* sur des récepteurs dihétéromériques, c'est-à-dire contenant uniquement deux des sous-unités différentes, par exemple GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B. L'étude pharmacologique des trihétéromères est plus difficile puisqu'en faisant exprimer trois sous-unités dans une cellule, par exemple GluN1, GluN2A et GluN2B, on obtient un mélange de trois populations de récepteurs : des récepteurs dihétéromériques GluN1/GluN2A, des récepteurs dihétéromériques GluN1/GluN2B et des récepteurs trihétéromériques GluN1/GluN2A/GluN2B (Stroebel et al. 2018). Cependant, connaître l'effet d'une drogue sur les récepteurs contenant trois sous-unités différentes revêt une grande importance pour des approches thérapeutiques car les trihétéromères sont majoritaires à certaines synapses et sont probablement les récepteurs NMDA les plus abondants du cerveau antérieur adulte (Rauner and Kohr 2011, Paoletti et al. 2013).

La première stratégie mise en œuvre pour étudier les trihétéromères a été l'utilisation de mutations ponctuelles, qui en un seul ou en deux exemplaires selon les cas, altèrent la sensibilité au glutamate, au magnésium ou au zinc, pour se débarrasser pharmacologiquement des récepteurs dihétéromériques. Cette approche élégante a permis de montrer que la présence d'un seul site de liaison du zinc ou de l'ifenprodil permettait d'obtenir une modulation partielle (Hatton and Paoletti 2005). Plus tard, deux études utilisant la même stratégie basée sur les signaux de rétention complémentaires des récepteurs GABA<sub>B</sub> parviennent à une expression exclusive de trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B permettant d'étudier en détail les propriétés pharmacologiques de ces récepteurs (Hansen et al. 2014, Stroebel et al. 2014). Elles montrent que ces récepteurs possèdent un phénotype pharmacologique intermédiaire comparé à ceux des dihétéromères, mais généralement plus proche de GluN2A (Figure 1.4-18). Ainsi, la probabilité d'ouverture, la cinétique de désactivation du glutamate, la sensibilité aux agonistes, au pH, au zinc, au TCN-201 et à l'ifenprodil des récepteurs trihétéromériques GluN1/GluN2A/GluN2B sont entre celles des dihétéromères

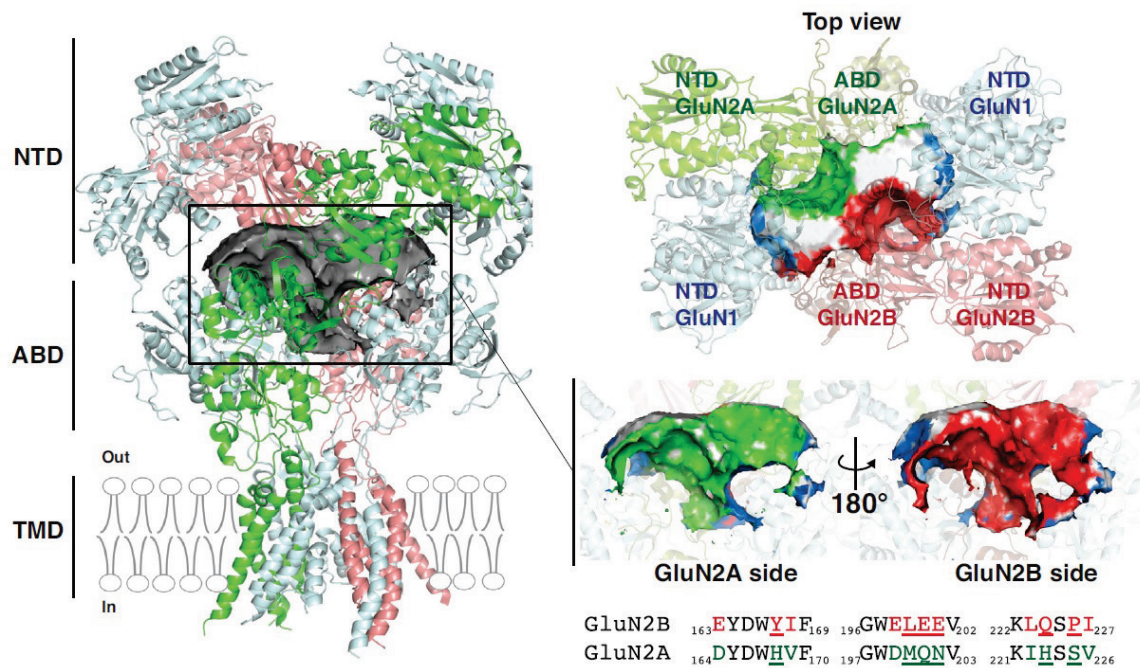
GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. Les courbes dose-réponse au zinc et à l'ifenprodil sont biphasiques, révélant une forme d'indépendance dans la contribution des deux sous-unités GluN2. La sensibilité à la spermine est une exception notable : alors que les dihéromères contenant la sous-unité GluN2B sont très sensibles à la spermine, les trihéromères  $\gamma$  sont complètement insensibles, montrant la nécessité de la présence de deux copies de GluN2B pour l'action de ce modulateur allostérique positif. Enfin, la sensibilité des trihéromères au GNE-6901 est également intermédiaire à celles des dihéromères (Hackos et al. 2016).

La première structure de récepteur NMDA trihéromérique GluN1/GluN2A/GluN2B entière est parue en 2017 (Figure 1.4-19 ; Lu et al. 2017). Elle révèle une différence d'arrangement relativement subtile entre les dimères GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B au sein du tétramère, dont l'interprétation reste difficile. Elle permet néanmoins de repérer une cavité spécifique des trihéromères car mettant en jeu à la fois la sous-unité GluN2A et la sous-unité GluN2B et située au centre de la partie extracellulaire, entre les 8 domaines bilobés (Stroebel et al. 2018). Cette poche est bordée en haut par les lobes R2 des NTDs des deux sous-unités GluN2 et en bas par les lobes du haut de leurs ABDs (Figure 1.4-19). La région homologue chez le récepteur AMPA constitue le site de liaison d'un polypeptide, la toxine con-ikot-ikot (Chen et al. 2014). Un ciblage de cette cavité permettrait peut-être de trouver des composés pharmacologiques sélectifs pour étudier le rôle des trihéromères en contexte physiologique (Tovar et al. 2013, Stroebel et al. 2018).



**Figure 1.4-18 : Propriétés fonctionnelles des trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B.**

**A** Sensibilité au glutamate. **B** Sensibilité à la glycine. **C** Cinétique d'inhibition par 10 nM de MK-801. **D** Cinétique de désactivation du glutamate. **E** Sensibilité aux protons. **F** Sensibilité au zinc. **G** Sensibilité à l'ifenprodil. **H** Sensibilité à la spermine avec à droite des traces montrant l'effet de 100  $\mu$ M de spermine au potentiel de -30mV à pH 6.5. Malgré la présence d'une sous-unité GluN2B, les trihétéromères sont insensibles à la spermine (Stroebelet al. 2014).



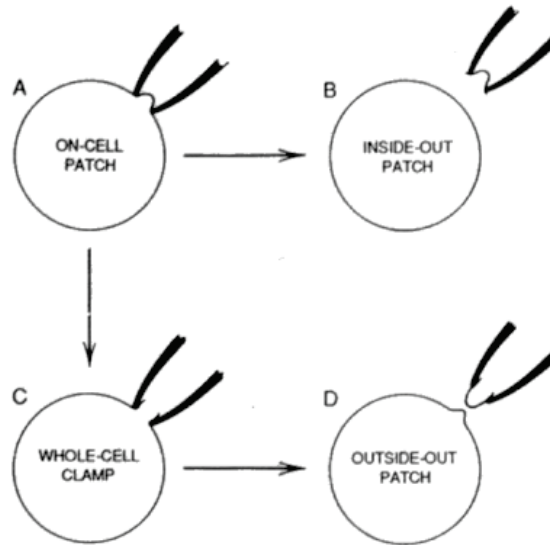
**Figure 1.4-19 : Structure du trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B.**

À gauche, structure du trihétéromères avec GluN1 en gris, GluN2A en vert et GluN2B en rouge. La cavité centrale de 20 nm<sup>3</sup> est représentée par une surface grise. À droite en haut, vue du dessus de la poche. Au milieu, vue du côté GluN2A ou GluN2B. L'enveloppe est colorée en fonction de la sous-unité qui la jouxte (bleu pour GluN1, vert pour GluN2A, rouge pour GluN2B et blanc pour l'espace accessible au solvant). En bas, alignement de la séquence des boucles participant à la cavité chez le rat mettant en évidence les résidus non-conservés (en couleur) et ceux participant directement à la poche (soulignés). Les différences entre GluN2A et GluN2B sont à l'origine de l'originalité de cette cavité comparée à celles des récepteurs dihétéromériques (Stroebel et al. 2018).

## **1.5. Analyse cinétique des récepteurs NMDA**

### **1.5.1. Modèle cinétique de l'activation d'un récepteur-canal**

Il est possible d'analyser l'activité d'un récepteur-canal unique en temps réel lors d'expériences de patch-clamp (Hamill et al. 1981). Cette technique d'électrophysiologie, dont le développement par Bert Sakmann et Erwin Neher a été récompensé par le prix Nobel de physiologie ou de médecine en 1991 consiste à mettre en continuité électrique une micropipette en verre avec la membrane d'une cellule ce qui permet d'enregistrer les courants ioniques à travers cette membrane ou l'évolution de son potentiel. Les micropipettes utilisées sont obtenues par chauffage et étirement de fins capillaires de verre. Elles sont remplies d'une solution conductrice qui diffère selon la configuration que l'on souhaite utiliser (Figure 1.5-1). Le diamètre de la pointe de la pipette qui détermine la taille de la zone membranaire que l'on va contacter est généralement de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . Une difficulté majeure est de réussir à étanchéifier le contact entre la pipette et la membrane. La qualité du contact entre les deux éléments est évaluée par la résistance de jonction entre les deux éléments.



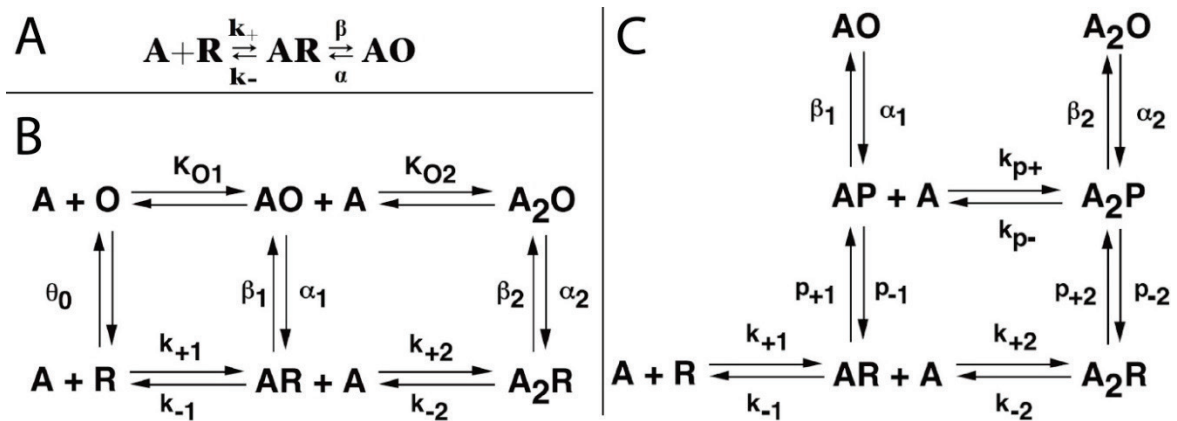
**Figure 1.5-1 : Les différentes configurations utilisées en patch-clamp.**

**A** La configuration 'On-cell', où la membrane cellulaire est intacte et la pipette est hermétiquement attachée à la cellule, permet d'analyser l'activité des canaux présents dans la surface membranaire à l'intérieur de la pipette tout en préservant l'intégrité du milieu intracellulaire. **B** La configuration 'Inside out', est obtenue en arrachant le morceau de membrane scellé à la pipette dans la situation précédente. Elle permet d'appliquer différentes solutions côté intracellulaire. **C** La configuration 'Whole-cell' est obtenue à partir de la configuration 'On-cell' par une dépression à l'intérieur de la pipette qui perce le morceau de membrane attaché. Elle permet d'enregistrer l'activité de tous les canaux présents dans la membrane cellulaire. Le milieu intracellulaire est alors envahi par le contenu de la pipette. **D** La configuration 'Outside-out' obtenue depuis la configuration 'whole-cell' en arrachant un morceau de membrane qui se referme spontanément permet d'appliquer des solutions du côté extracellulaire. Elle est particulièrement utile pour les récepteurs aux neurotransmetteurs lorsque l'on veut placer le site de liaison de l'agoniste dans différentes conditions.

Lors d'une expérience en canal unique ('single channel'), l'expérimentateur parvient à isoler dans sa pipette un unique récepteur ionotropique ce qui lui permet de suivre et d'enregistrer son activité (Gibb and Colquhoun 1992, Hille 2001). Un enregistrement suffisamment long permet alors de s'assurer qu'il n'y a aucune période de double ouverture et de vérifier que l'on est bien en présence d'un seul canal. Les propriétés unitaires du récepteur, telles sa probabilité d'ouverture absolue ( $P_o$ , proportion du temps que le récepteur passe ouvert en présence d'agonistes en conditions saturantes), ou sa conductance unitaire peuvent alors être mesurées. Certains canaux possèdent

différents niveaux de conductance, correspondant à différents états d'ouverture du canal plus ou moins perméables. Les expériences en canal unique permettent également d'étudier les propriétés cinétiques du mécanisme d'activation des récepteurs. Les modèles cinétiques appliqués aux récepteurs-canaux sont des processus de Markov, c'est-à-dire des processus sans mémoire (Sakmann and Neher 2009) : la prédiction de la trajectoire d'un récepteur entre ses différents états possibles dans le modèle n'est pas améliorable par la connaissance des états qu'il a parcourus auparavant. Le passage d'un état à un autre est déterminé par des constantes de vitesse qui, appliquées à des molécules uniques, peuvent être vues comme des probabilités. La durée de vie d'un état est modélisée par une distribution exponentielle. Par l'analyse de la distribution des périodes d'ouverture et de fermeture des canaux uniques, on peut parvenir à déterminer le nombre d'états ouverts et fermés cinétiquement distincts et à calculer les constantes qui les relient. La compréhension du fonctionnement du récepteur à l'échelle de la molécule unique (niveau(x) de courant unitaire(s), probabilité d'ouverture, décours temporel de l'activation, modèle cinétique) doit permettre de retrouver et d'expliquer les propriétés de ses courants macroscopiques (Sakmann and Neher 2009).

Les premières études réalisées sur le récepteur nicotinique à l'acétylcholine de la jonction neuromusculaire ont montré que même en condition d'agoniste en concentration saturante, les récepteurs n'étaient pas actifs en permanence. La distinction a alors été faite dans le mécanisme d'activation entre l'affinité de l'agoniste, c'est-à-dire sa capacité à se lier au récepteur, et son efficacité, qui correspond à sa capacité à stabiliser l'état ouvert du canal lorsqu'il est lié (Figure 1.5-2, Del Castillo and Katz 1957). Ensuite, les longs états non conducteurs, appelés états désensibilisés ont été ajoutés au schéma cinétique (Katz and Thesleff 1957), et la présence de plusieurs sites de liaison de l'agoniste, découverte par la suite, a été prise en compte (Karlin 1967). Suite à ces premières étapes, d'autres améliorations ont été apportées au mécanisme, le complexifiant mais permettant de décrire fidèlement l'activation du récepteur et le décours temporel des courants de la jonction neuromusculaire (Colquhoun and Sakmann 1985, Gibb 2004, Bouzat and Sine 2017).



**Figure 1.5-2 : Évolution du schéma cinétique décrivant l'activation du récepteur nicotinique à l'acétylcholine depuis 1957.**

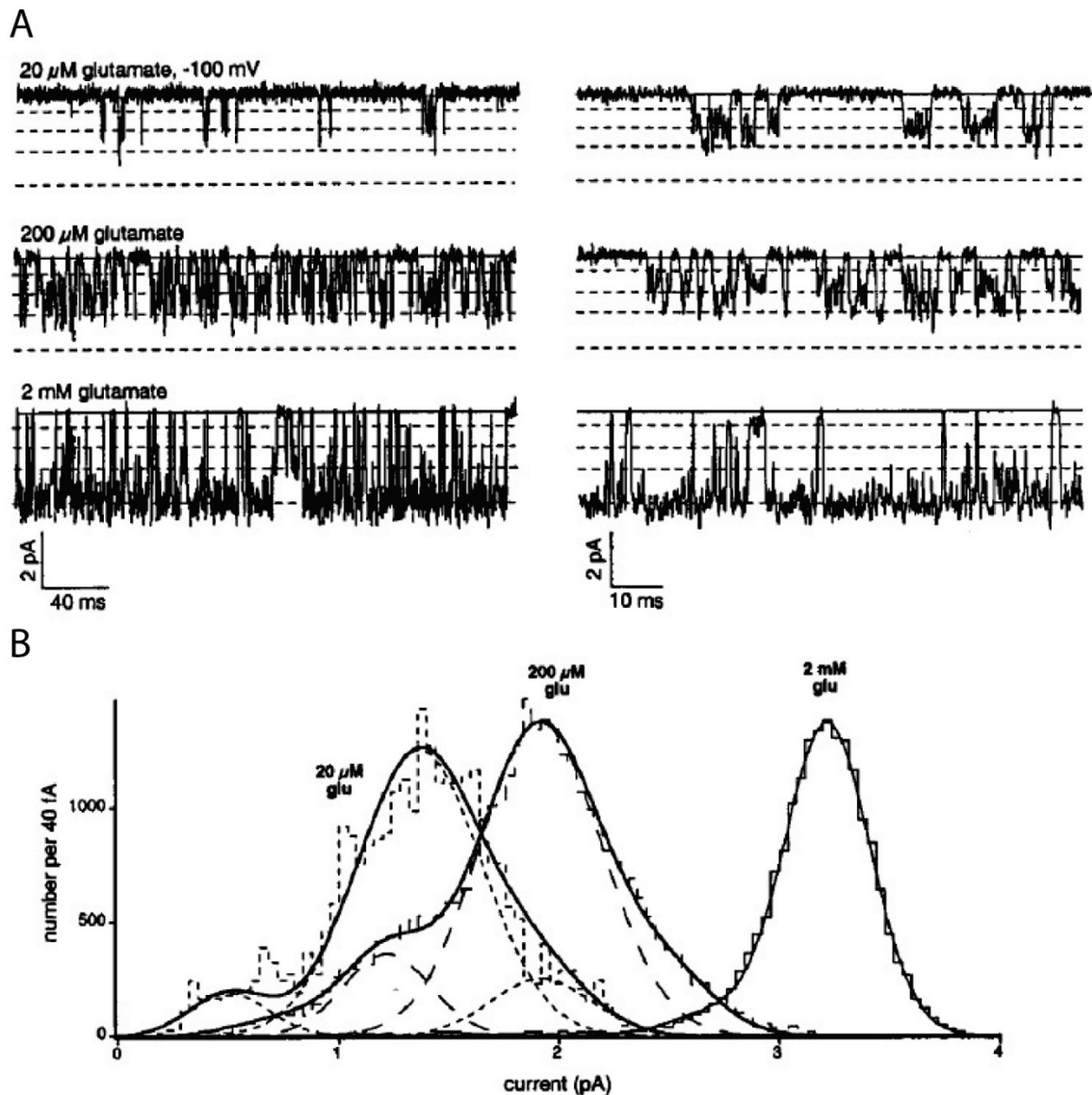
**A** La séparation entre affinité et efficacité permet de rendre compte des expériences mettant en jeu des agonistes partiels, qui peuvent se lier au récepteur en déclenchant une réponse moins importante (Del Castillo and Katz 1957). **B** La découverte de la présence de deux sites de liaison de l'agoniste, de périodes d'ouvertures en absence d'agoniste et d'une coopérativité positive dans la courbe dose-réponse a mené à replacer l'activation dans le cadre d'un mécanisme allostérique de type Monod-Wyman-Changeux (Monod et al. 1965, Dionne et al. 1978, Jackson 1986, Jackson 1988). **C** Des études récentes proposent une étape d'amorçage avant l'ouverture qui met en jeu des états pré-ouverts (pre-open) afin de représenter au mieux les données d'activation (Bouzat and Sine 2017).

Chez les récepteurs canaux du glutamate, la situation est très différente en fonction des types de récepteur. En effet, les récepteurs AMPA présentent 4 différents niveaux de sous-conductances qui suggèrent une participation relativement indépendante des différentes sous-unités à l'ouverture du canal (Figure 1.5-3). Ainsi, le canal peut s'ouvrir avec une conductance moindre lorsque les différents sites de fixation de l'agoniste ne sont pas tous occupés (Rosenmund et al. 1998, Smith and Howe 2000, Smith et al. 2000, Gebhardt and Cull-Candy 2006).

Chez les récepteurs NMDA en revanche, les 4 sites de fixation de l'agoniste doivent être occupés avant que l'ouverture ne soit possible (Stern et al. 1992, Stern et al. 1994, Paoletti 2011). Nous nous limiterons ici au cas des récepteurs NMDA, en insistant plus



particulièrement sur les étapes d'activation qui se produisent après la fixation des 4 molécules d'agoniste au niveau des ABDs.



**Figure 1.5-3: Les récepteurs AMPA possèdent différents niveaux de conductance unitaire en fonction du nombre d'agonistes liés.**

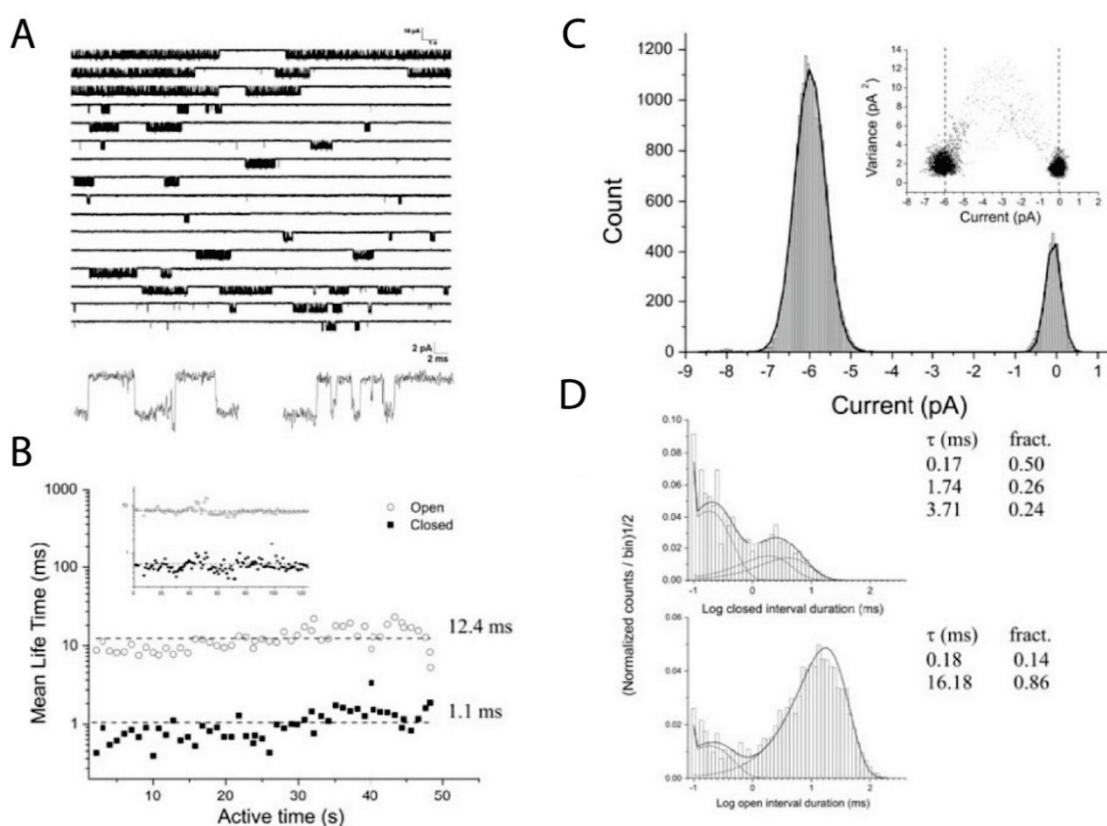
**A** Extraits représentatifs d'enregistrements de l'activité d'un récepteur AMPA unique dans un patch issu d'une cellule en grain à  $-100$  mV en présence de  $100 \mu\text{M}$  de cyclothiazide (une drogue qui empêche la désensibilisation du récepteur). **B** Histogramme de répartition des niveaux de courant lors des enregistrements montrés en **A**. Les niveaux de courant détectés sont fortement dépendants de la concentration en glutamate utilisée (Smith and Howe 2000).

## 1.5.2. Établissement du modèle cinétique des récepteurs NMDA

Le premier modèle cinétique de l'activation des récepteurs NMDA est paru en 1992 (Figure 1.5-5D ; Lester and Jahr 1992). Ce mécanisme se révéla efficace pour expliquer le déroulement des réponses macroscopiques synaptiques mais pas pour certains aspects des données en canal unique comme les périodes d'ouverture du canal ou le nombre d'états fermés et ouverts (Gibb and Colquhoun 1991, Gibb and Colquhoun 1992, Edmonds et al. 1995). Le modèle cinétique utilisé aujourd'hui a été proposé pour la première fois en 2003 par deux groupes différents (Banke and Traynelis 2003, Popescu and Auerbach 2003). Dans un cas, des récepteurs GluN1/GluN2A uniques ont été soumis à pH 8 à une concentration saturante de glutamate et de glycine en configuration cell-attached en présence d'un chélateur de  $Mg^{2+}$  (un exemple d'enregistrements de la même équipe avec le même protocole dans une étude ultérieure est donné Figure 1.5-4). Afin de trouver un modèle cinétique qui reproduise les enregistrements, les auteurs ont testé des mécanismes de complexité croissante. Ils arrivent à la conclusion qu'ils ont besoin d'au moins 5 états fermés et 2 états ouverts distincts pour reproduire fidèlement les données expérimentales. 2 des 5 états fermés sont des états désensibilisés longs. Cette approche qui part des données sans *a priori* peut être qualifiée d'ascendante ('bottom-up') (Popescu and Auerbach 2003, Popescu and Auerbach 2004).

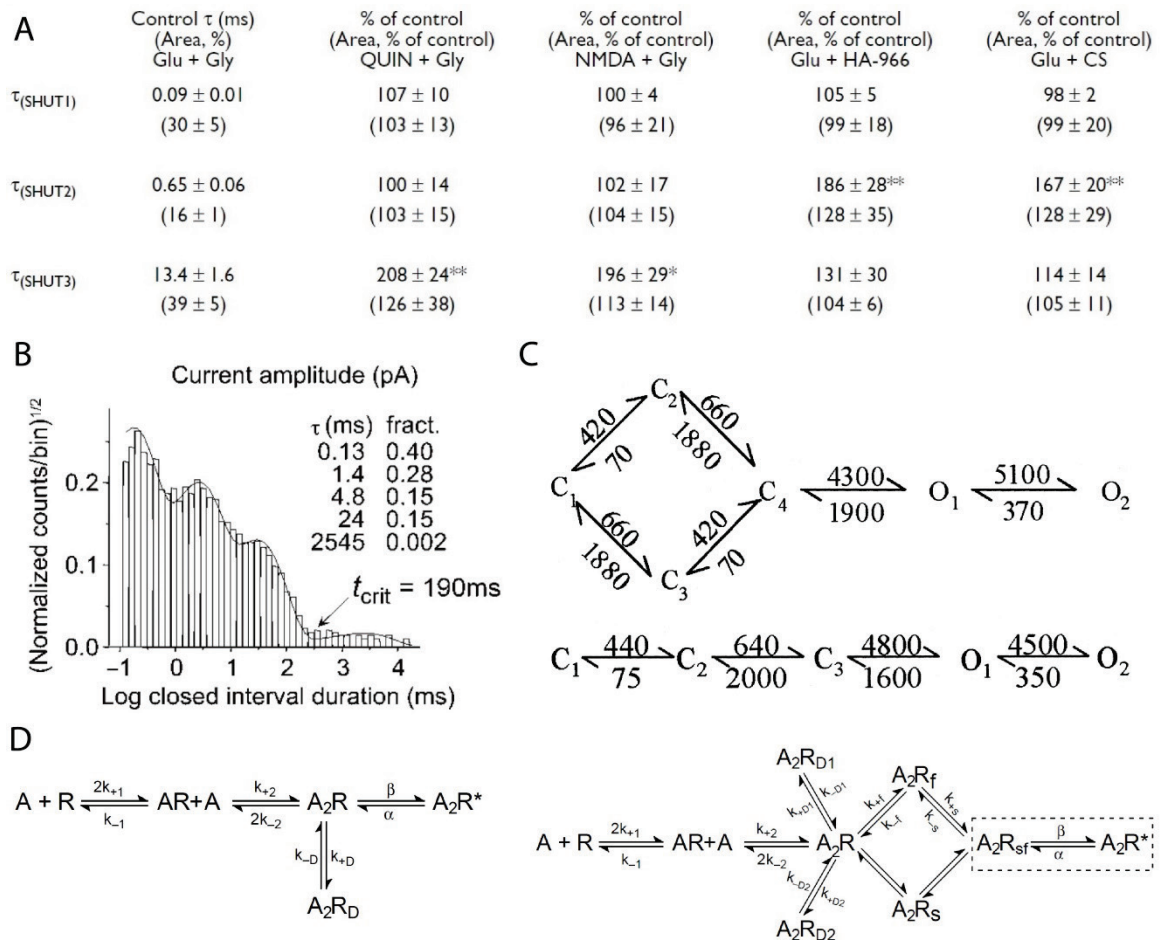
Dans l'autre étude, des récepteurs GluN1/GluN2B ont été étudiés à pH 7.4 en configuration outside-out à concentration saturante de glutamate et de glycine, également en l'absence de magnésium (Banke and Traynelis 2003). Dans ce cas encore, 5 états inactifs distincts sont envisagés, et deux de ces états sont attribués à des formes de désensibilisation à partir de l'analyse macroscopique de la récupération après désensibilisation. L'hypothèse est alors faite que parmi les 3 composantes restantes, l'une d'entre elle est liée à un changement de conformation de GluN1, l'autre à un changement de conformation de GluN2B et la dernière correspond à une ouverture concertée du canal. Lors de la comparaison entre des enregistrements faits avec les deux agonistes totaux glutamate et glycine et des enregistrements faits en substituant l'un des deux par un agoniste partiel, une seule composante temporelle des périodes de

fermeture est modifiée à chaque fois selon la sous-unité concernée ce qui supporte leur hypothèse (Figure 1.5-5). On peut à présent relier leur proposition à l'asymétrie entre les sous-unités A/C et B/D (Figure 1.3-2) dont la conformation des linkers est très dissemblable (Karakas and Furukawa 2014, Kazi et al. 2014, Lee et al. 2014). Dans ce cas, on pourrait qualifier l'approche de descendante ('top-down') car on part d'une hypothèse pour expliquer les données (Banke and Traynelis 2003, Popescu and Auerbach 2004).



**Figure 1.5-4 : Activité du récepteur NMDA unitaire GluN1/GluN2A.**

**A** Enregistrement en présence de 1 mM de glutamate, 100  $\mu$ M de glycine et 1 mM d'EDTA de l'activité d'un canal unique en configuration outside-out à -80 mV. **B** Evolution de la moyenne des temps d'ouverture et de fermeture à chaque seconde pendant l'enregistrement montrant que ces valeurs sont stables au cours du temps. **C** Distribution en deux pics des niveaux de courants illustrant l'existence d'une unique conductance pour les récepteurs NMDA. **D** Distribution des durées d'ouverture et de fermeture du canal sur une échelle logarithmique. Les longues périodes de fermeture correspondant aux états désensibilisés ont été retirées (Auerbach and Zhou 2005).



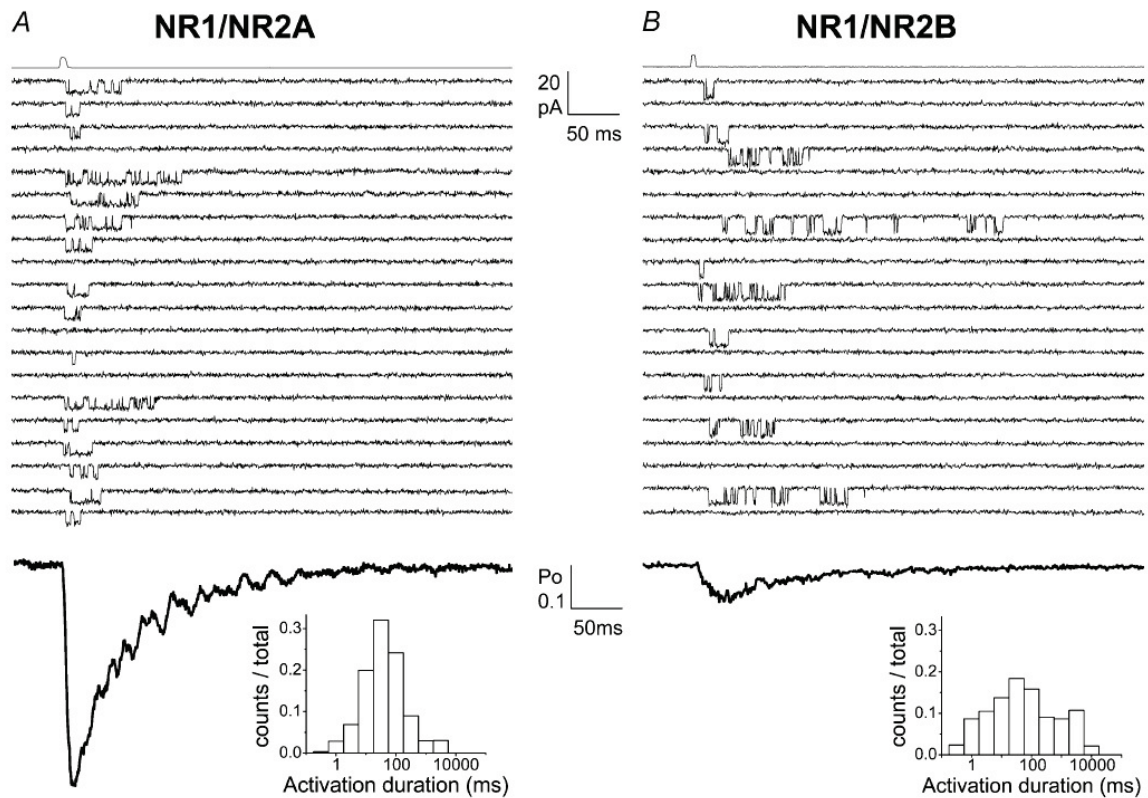
**Figure 1.5-5 : Modèles cinétiques de l'activation du récepteur NMDA.**

**A** Influence de la substitution d'un agoniste total par un agoniste partiel sur les différentes composantes temporelles de la distribution des durées de fermeture chez le récepteur GluN1/GluN2B. On remarque que la substitution du glutamate par de l'acide quinolinique ou du NMDA double la composante temporelle lente  $\tau_{(SHUT3)}$  tandis que la substitution de la glycine par de la cycloserine (CS) ou du HA-966 modifie la composante temporelle intermédiaire  $\tau_{(SHUT2)}$  (Banke and Traynelis 2003). **B** Distribution des durées de fermeture du canal sur une échelle logarithmique pour des récepteurs GluN1/GluN2A. Les longues périodes de fermeture, au-delà du temps critique, correspondent aux états désensibilisés (Popescu and Auerbach 2003). **C** Les deux principaux modèles cinétiques proposés pour les récepteurs NMDA accompagnés des constantes cinétiques relatives à GluN1/GluN2A ( $s^{-1}$ ). En haut, la contribution des sous-unités GluN1 et GluN2 est indépendante et peut se produire dans n'importe quel ordre. Le mécanisme du bas impose que le réarrangement lent (hypothétiquement lié à GluN2) se produit en premier. Ces modèles cinétiques s'appliquent à des récepteurs perpétuellement saturés en agonistes, et ne représentent pas les états désensibilisés (Auerbach and Zhou 2005). **D** Évolution du modèle d'activation des récepteurs NMDA avec à gauche le premier modèle proposé (Lester and Jahr 1992) et à droite un exemple de modèle actuel avec deux états désensibilisés différents et plusieurs états liés aux agonistes mais inactifs. R\* représente l'état actif (Banke and Traynelis 2003, Gibb 2004).

Ces deux approches conceptuellement différentes, sur des sous-types de récepteurs distincts, parviennent à un résultat semblable en termes de schéma d'activation et identique en termes de nombre d'états cinétiquement discernables. Une étude ultérieure, analysant toutes les possibilités de branchement d'un modèle cinétique à 3 états fermés et 2 états ouverts a confirmé ces premiers résultats (Figure 1.5-5, Auerbach and Zhou 2005).

### **1.5.3. Comparaison entre les récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B**

Les récepteurs GluN1/GluN2A et les récepteurs GluN1/GluN2B restent tous deux ouverts plusieurs dizaines de millisecondes après une brève application de glutamate, démontrant leur capacité à retenir la molécule liée au niveau de l'ABD alors que sa concentration ambiante a déjà chuté (Paoletti 2011). Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A s'activent légèrement plus rapidement et plus fréquemment, tandis que ceux contenant la sous-unité GluN2B sont ceux qui ont l'activation la plus longue (Figure 1.5-6 ; Erreger et al. 2005). Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A ont une plus grande probabilité d'ouverture ( $P_o$ ) que les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B. Cependant, le même modèle cinétique de mécanisme d'activation représente de façon satisfaisante l'activation des deux sous-types (Figure 1.5-7), avec au moins une constante plus rapide pour les récepteurs contenant GluN2A, ce changement étant suffisant pour expliquer la différence de  $P_o$  (Erreger et al. 2005, Traynelis et al. 2010).



**Figure 1.5-6 : Comparaison de la cinétique d'activation des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B.**

En réponse à une application brève (3-8 ms) de 1 mM de glutamate en présence continue de 50 μM de glycine, les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A s'ouvrent plus fréquemment et légèrement plus rapidement. Leur ouverture est cependant plus courte (Erreger et al. 2005).

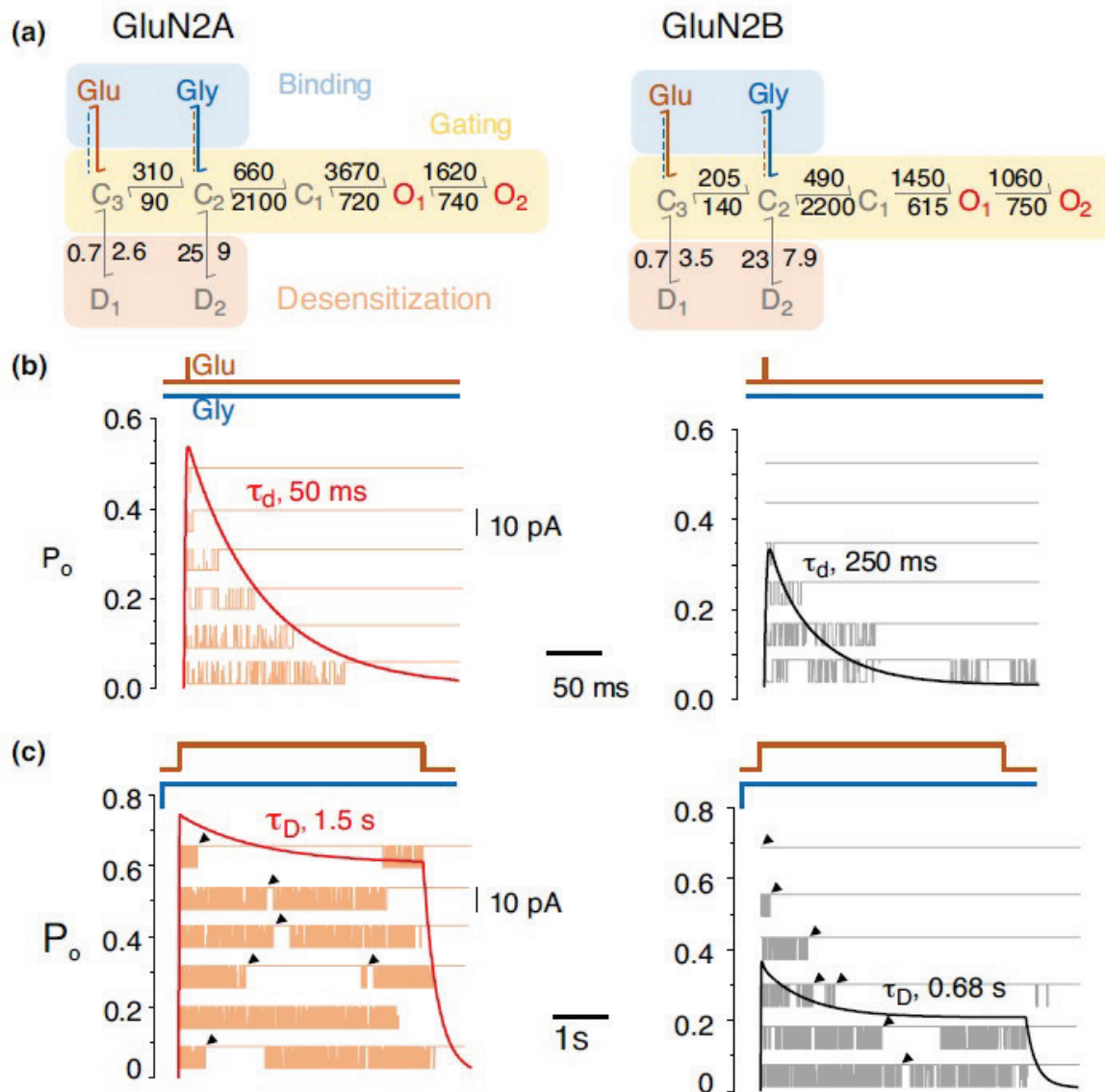
#### 1.5.4. Impact des modulateurs allostériques et de mutations

L'effet d'un modulateur allostérique sur l'activité du récepteur NMDA se traduit nécessairement à l'échelle de la molécule unique au niveau du mécanisme d'activation. Les expériences en canal unique ont montré que même liés à des modulateurs, les récepteurs suivent la même séquence d'activation à 5 états fermés et deux états ouverts. Ce sont les transitions entre les états qui sont affectées sans qu'il ne soit nécessaire de modifier le modèle cinétique pour rendre compte des changements

observés (Iacobucci and Popescu 2018). Les modulateurs peuvent cependant affecter des transitions très diverses. La numérotation des états fermés n'étant pas homogène dans la littérature, on se servira ici de celle présentée Figure 1.5-7.

Les protons sont les premiers à avoir été étudiés. Une baisse de pH touche toutes les étapes du schéma cinétique de GluN1/GluN2B, piégeant les récepteurs dans un état non conducteur (Banke et al. 2005). Toujours sur GluN1-GluN2B, l'ifenprodil semble plutôt affecter la transition précoce C3-C2, avec cependant également un effet sur la transition d'ouverture C1-O (Amico-Ruvio et al. 2012). Sur GluN1/GluN2A, l'ajout de zinc ralentit toutes les transitions vers l'état ouvert, sans affecter les états désensibilisés, avec un effet plus important sur la transition C1-O1 (Amico-Ruvio et al. 2011). La suppression du pont disulfure qui contrôle la sensibilité redox des récepteurs (Sullivan et al. 1994), par utilisation d'un agent réducteur ou par mutagénèse, affecte principalement les transitions entre états ouverts (Talukder et al. 2011). Enfin, l'insertion de résidus glycine dans le linker TM3-S2 qui est directement relié à la 'gate' affecte uniquement la transition C1-O1 si réalisée sur GluN1 et ralentit toutes les transitions vers l'état ouvert si réalisée sur GluN2A (Kazi et al. 2014).

Avec la multiplication des structures complètes de récepteurs entiers dans différents états conformationnels, un objectif séduisant est de parvenir à relier ces structures ou ensembles de structure à des états cinétiquement discernables (Zhou and Wollmuth 2017). Cependant, même en gardant toujours le même modèle cinétique, la grande variété des conséquences des mutations ou de la liaison des différents modulateurs allostériques sur les transitions rend l'interprétation structurale difficile, d'autant plus que si la plupart des sites de fixation des modulateurs sont connus, leur mécanisme d'action n'est le plus souvent pas élucidé. Même si la correspondance entre états cinétiques et états structuraux reste obscure, les tentatives de relier les deux chez le récepteur nicotinique à l'acétylcholine laissent espérer des progrès à ce niveau (Gupta et al. 2017).



**Figure 1.5-7: Modèles cinétiques de l'activation des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B.**

L'activation des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B met en jeu les mêmes étapes cinétiques, mais avec des constantes de transition différentes. **A** Modèles cinétiques tirés d'enregistrements en présence continue de concentrations saturantes de glutamate et glycine. Après l'étape de liaison, le récepteur a accès à deux états ouverts et 5 états fermés dont deux sont des états désensibilisés longs. Les constantes cinétiques sont en  $s^{-1}$ . **B** Simulation des courants déclenchés en réponse à une exposition à 1 mM de glutamate pendant 1 ms en présence de 100  $\mu M$  de glycine avec le modèle cinétique présenté en A. La brève exposition au glutamate reproduit les conditions d'une libération synaptique. **C** Simulation des courants déclenchés en réponse à une exposition longue (5 s) de 1 mM de glutamate en présence de 100  $\mu M$  de glycine (Iacobucci and Popescu 2018).

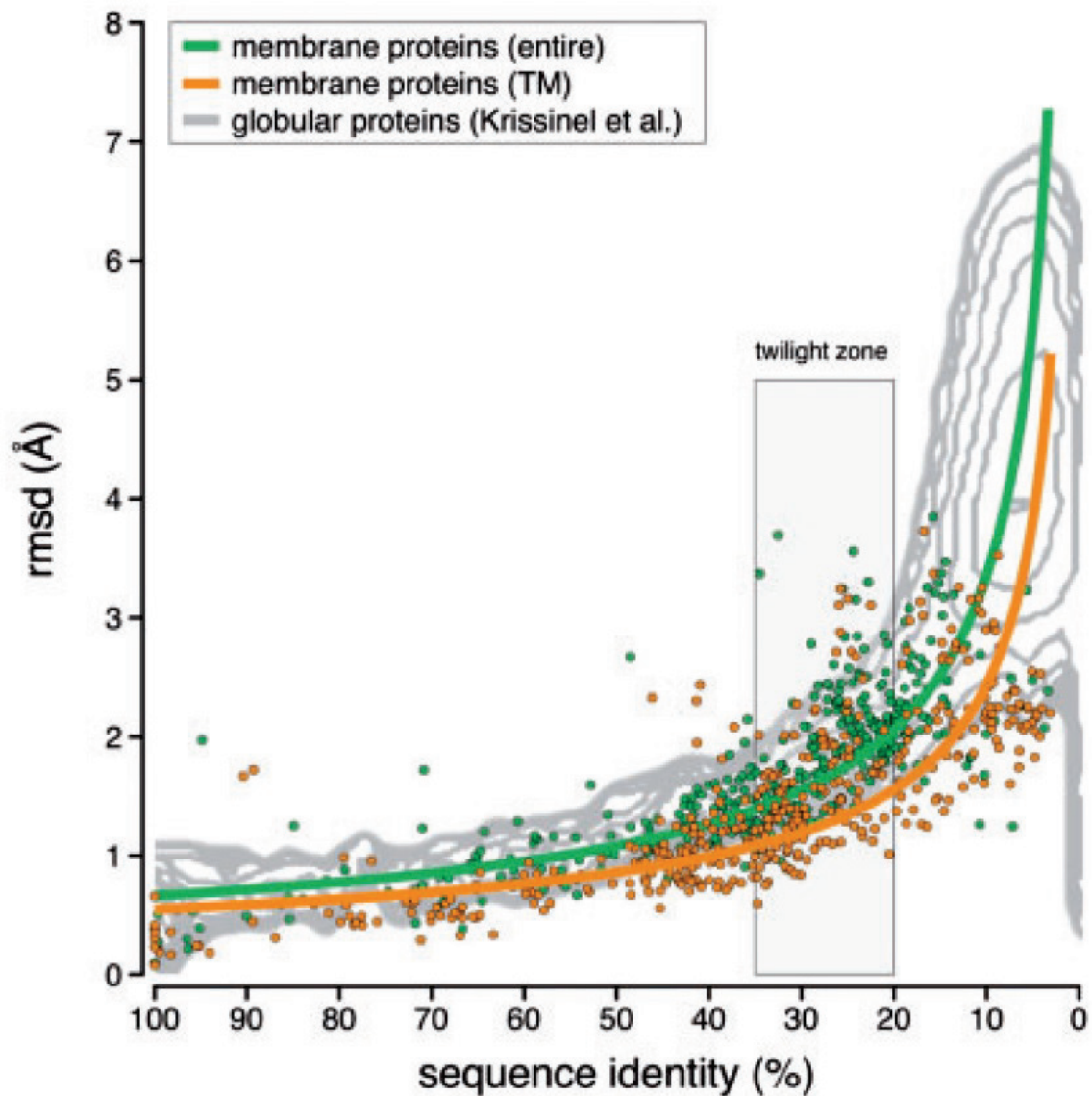


## 1.6. Modélisation des récepteurs ionotropiques du glutamate

### 1.6.1. Modélisation par homologie

#### 1.6.1.1. Principe

La modélisation par homologie, ou modélisation comparative, permet de construire un modèle en trois dimensions d'une protéine à partir de sa séquence et de la structure d'une protéine homologue (Sali 1995). Cette méthode repose sur le fait qu'une similarité de séquence se traduit par une similarité de structure (Chothia and Lesk 1986). Plus l'homologie de séquence est forte, plus l'homologie de structure le sera, avec un seuil de 20 % d'identité de séquence sous lequel on peut trouver de fortes divergences (Figure 1.6-1). La séquence de la protéine à modéliser est alignée sur le modèle et la qualité du modèle par homologie dépend fortement de la qualité de cet alignement. Une des principales difficultés réside dans la reconstitution des parties manquantes, soit non résolues dans la structure guide, soit du fait d'une insertion ou délétion entre les deux séquences. Cette reconstruction est alors faite *ab initio* ce qui aboutit à des résultats beaucoup moins précis. D'abord appliquée aux protéines solubles, cette technique fonctionne également pour les protéines membranaires (Olivella et al. 2013).



**Figure 1.6-1 : Comparaison entre l'identité de séquence et le rmsd pour les protéines membranaires et solubles.**

Le RMSD ('root mean square deviation') est une mesure de la différence de structure tridimensionnelle entre deux protéines. Les deux courbes présentées sont des fits de la relation entre rmsd et identité de séquence pour les protéines membranaires entières en vert et les segments transmembranaires uniquement en orange. En arrière-plan figurent les données pour les protéines solubles sous la forme contour de densité de probabilité d'obtenir des alignements 3D avec le RMSD correspondant. On note que la similarité structurale est plus forte pour les parties membranaires des protéines pour une même identité de séquence (Olivella et al. 2013).

### ***1.6.1.2. Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate***

La modélisation par homologie a été utilisée pour modéliser le domaine N-terminal de GluN2B afin de déterminer le site de fixation de l'ifenprodil avant que la structure du complexe ne soit résolue (Mony et al. 2009b). Le modèle a été basé sur la structure du domaine de liaison de l'agoniste du récepteur métabotrope du glutamate mGluR1 (pdb 1ewk). Cependant, la forme twistée des NTDs des récepteurs NMDA était alors inconnue ce qui a conduit à un modèle inexact. Même si les structures des NTDs de récepteurs AMPA (Clayton et al. 2009, Jin et al. 2009), kainate (Kumar et al. 2009) et NMDA (Karakas et al. 2009) qui sont parues par la suite ont confirmé l'appartenance de ces domaines à la famille des protéines LIVBP, comme le domaine de liaison de l'agoniste de mGluR1, la torsion de 50° entre le lobe R1 et le lobe R2 était complètement inattendue. La position de la poche ifenprodil n'a été confirmée qu'encore plus tard avec la parution du dimère de NTD (Karakas et al. 2011).

La machinerie d'activation (domaines ABD et TMD) du récepteur NMDA a été modélisée par homologie avec les récepteurs AMPA dans une étude visant à simuler l'ouverture du canal alors que la structure du récepteur NMDA n'était pas encore parue (voir plus bas 1.6.2.3 ; Dai and Zhou 2013).

Plus récemment un modèle par homologie de pore ouvert a été proposé pour le récepteur NMDA en partant des structures fermées (Pang and Zhou 2017). Ce modèle a été proposé juste avant que ne paraisse la première structure ouverte d'un récepteur-canal du glutamate, celle de l'homotétramère GluA2 (Twomey et al. 2017a). À partir de la structure fermée, l'arrangement des hélices transmembranaires a été modifié pour obtenir un canal ouvert avant d'être raffiné par une simulation de dynamique moléculaire en membrane explicite (voir 1.6.2.1). Ce modèle de TMD ouvert de récepteur NMDA présente un RMSD ('root mean square deviation') de 3.7 Å avec la structure publiée pour le TMD ouvert de récepteur AMPA calculé sur 288 C $\alpha$ . Cette différence peut s'expliquer à la fois par une différence de structure entre les deux sous-types de récepteurs du glutamate et par l'inexactitude inhérente à l'utilisation de la modélisation par homologie. Une évaluation très grossière de ce résultat peut être

proposée sachant que les TMD des différents récepteurs-canaux du glutamate partagent au minimum 10 % d'identité de séquence si l'on considère les résidus identiques entre toutes les sous-unités (Traynelis et al. 2010). L'identité entre GluA2 et GluN1/GluN2B seuls est probablement plus importante. D'après la Figure 1.6-1, on peut donc s'attendre pour une structure exacte du TMD de récepteur NMDA ouvert à un RMSD inférieur à 3 comparé au TMD du récepteur AMPA.

La parution récente d'une multitude de structures complètes des récepteurs canaux du glutamate liée à l'explosion de la cryo-microscopie électronique a permis de mettre à jour les données structurales et de réduire le besoin de modélisation par homologie (Chen et al. 2014, Durr et al. 2014, Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014, Meyerson et al. 2014, Herguedas et al. 2016, Meyerson et al. 2016, Tajima et al. 2016, Twomey et al. 2016, Zhu et al. 2016, Lu et al. 2017, Twomey et al. 2017a, Twomey et al. 2017b)

Le challenge restant réside dans la production de modèles reconstituant les boucles manquantes, notamment les linkers qui relient les différentes couches de domaines. En effet, les linkers qui relient le NTD à l'ABD sont cruciaux dans les différences entre sous-types de récepteurs NMDA (Gielen et al. 2009, Yuan et al. 2009) et les linkers qui relient l'ABD au TMD sont bien évidemment essentiels au fonctionnement du récepteur (Kazi et al. 2013, Kazi et al. 2014). Du fait de leur flexibilité due à l'absence de structures secondaires, ces parties sont les principaux éléments manquants ou moins bien définis dans les structures récentes. Une fois cette limitation dépassée, la diversité de structures disponibles et les progrès de la simulation de dynamique moléculaire pour la modélisation de grosses protéines sont très prometteurs pour la reconstitution du fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate *in silico*.

## **1.6.2. Les simulations de dynamique moléculaire**

### ***1.6.2.1. Principe***

La simulation de dynamique moléculaire est une méthode permettant d'étudier le mouvement des molécules par des simulations informatiques. Elle nécessite comme

prérequis l'existence d'une structure (obtenue par exemple par cristallographie aux rayons X, RMN, cryo-microscopie électronique...), ou à défaut d'un modèle (par homologie ou *ab initio*) de la molécule considérée. Cette technique a l'avantage d'avoir la résolution suffisante pour observer les détails moléculaires des changements de conformation liés à la liaison d'un agoniste ou d'un modulateur allostérique (Karplus and McCammon 2002). La précision atomique permet de décrypter le rôle de résidus clés dans les changements conformationnels ou dans des processus essentiels comme la perméabilité ionique membranaire. Elle permet également de saisir des intermédiaires conformationnels dont l'instabilité empêche l'observation expérimentale (Howard et al. 2018).

Le système considéré, généralement constitué de la protéine d'intérêt dans un solvant qui peut être explicite (toutes les molécules du solvant sont représentées) ou implicite (représenté par des valeurs moyennes) est suivi au cours du temps par le calcul numérique du mouvement de ses atomes. Ce calcul repose sur la discrétisation de l'équation de Newton qui permet d'obtenir la vitesse d'une particule à partir de son potentiel.

$$\sum \vec{F}_i = m_i \vec{a}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = -\nabla_i V$$

C'est une méthode qui est coûteuse en termes de temps de calcul, notamment en fonction de la taille du système, du pas de temps considéré et du champ de force utilisé. L'étape la plus coûteuse en termes computationnels est l'évaluation du potentiel des particules en fonction de leurs coordonnées. C'est grâce à ce potentiel qu'est ensuite calculé leur mouvement jusqu'à l'intégration suivante. Le pas de temps considéré, qui est la durée entre deux évaluations du potentiel, doit être suffisamment faible pour éviter les erreurs de discrétisation, et donc plus faible que la fréquence de vibration la plus rapide du système, qui est généralement la fréquence de vibration des atomes d'hydrogène. L'ordre de grandeur du pas de temps est la femtoseconde ( $10^{-15}$  s), mais il peut être rallongé notamment en empêchant la vibration des atomes d'hydrogène (Zuckerman 2011).

### 1.6.2.2. Différents champs de force

Le champ de force est la fonction qui permet d'assigner à chaque particule considérée un potentiel qui sera ensuite utilisé pour calculer sa vitesse et donc son déplacement dans le prochain pas de temps. On parle d'un champ de force 'tout atome' lorsque le potentiel est calculé pour tous les atomes lors de la simulation, et de champs de force gros grain ('coarse grain') lorsque les molécules sont simplifiées et que l'on ne calcule un potentiel que pour le regroupement de plusieurs atomes. Dans un système gros grains, on peut par exemple ne considérer qu'une particule pour chaque acide aminé ou simplifier les chaînes latérales en ne considérant que quelques particules pour chacune. L'utilisation d'un système gros grains permet de simplifier le système, et donc de gagner en temps de calcul ou en longueur simulée mais elle induit une perte de précision.

On donne généralement à la fonction de potentiel, ou champ de force, la forme suivante qui sépare le potentiel lié aux interactions covalentes de celui lié aux interactions non covalentes :

$$E = E_{\text{covalente}} + E_{\text{non-covalente}}$$

L'étape la plus coûteuse dans l'évaluation du potentiel d'une particule est le calcul du terme lié aux interactions non covalentes, qui comprend le potentiel lié aux interactions de Van der Waals et celui lié aux interactions électrostatiques :

$$E_{\text{non-covalente}} = E_{\text{Van der Waals}} + E_{\text{électrostatique}}$$

En théorie, une particule interagit avec toutes les autres particules du système, mais un 'cutoff' (limite, coupure ou troncature) est utilisé pour éviter de perdre du temps à calculer des interactions négligeables notamment pour les interactions de Van der Waals qui varient en  $r^{-6}$ ,  $r$  étant la distance entre les deux particules considérées. Pour les interactions électrostatiques en revanche, qui peuvent agir de façon non négligeable sur des distances plus importantes, le cutoff considéré est adouci pour éviter un changement brutal de potentiel de part et d'autre, ou d'autres méthodes computationnelles sont utilisées pour le calcul comme Particle mesh Ewald (PME).

Le choix entre solvant, implicite, ou explicite est aussi très important en termes de temps de calcul car les molécules de solvant doivent être suffisamment nombreuses pour occuper tout l'espace disponible du système, augmentant d'un facteur 10 environ le nombre de particules, ce qui a de fortes répercussions : lorsque le solvant est explicite, la majorité du temps de calcul sert à calculer le potentiel des molécules du solvant. De ce fait, la simulation a généralement lieu dans une boîte de forme et dimension optimisée pour limiter la quantité de solvant nécessaire. Pour éviter les effets de bord, on utilise la périodicité : toute particule qui sort d'un côté de la boîte rentre par l'autre côté rendant l'espace 'infini'. Selon la méthode utilisée, le temps de calcul augmente en  $n^2$ ,  $n \cdot \log(n)$  voire de façon proportionnelle au nombre de particules simulées.

### ***1.6.2.3. Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate***

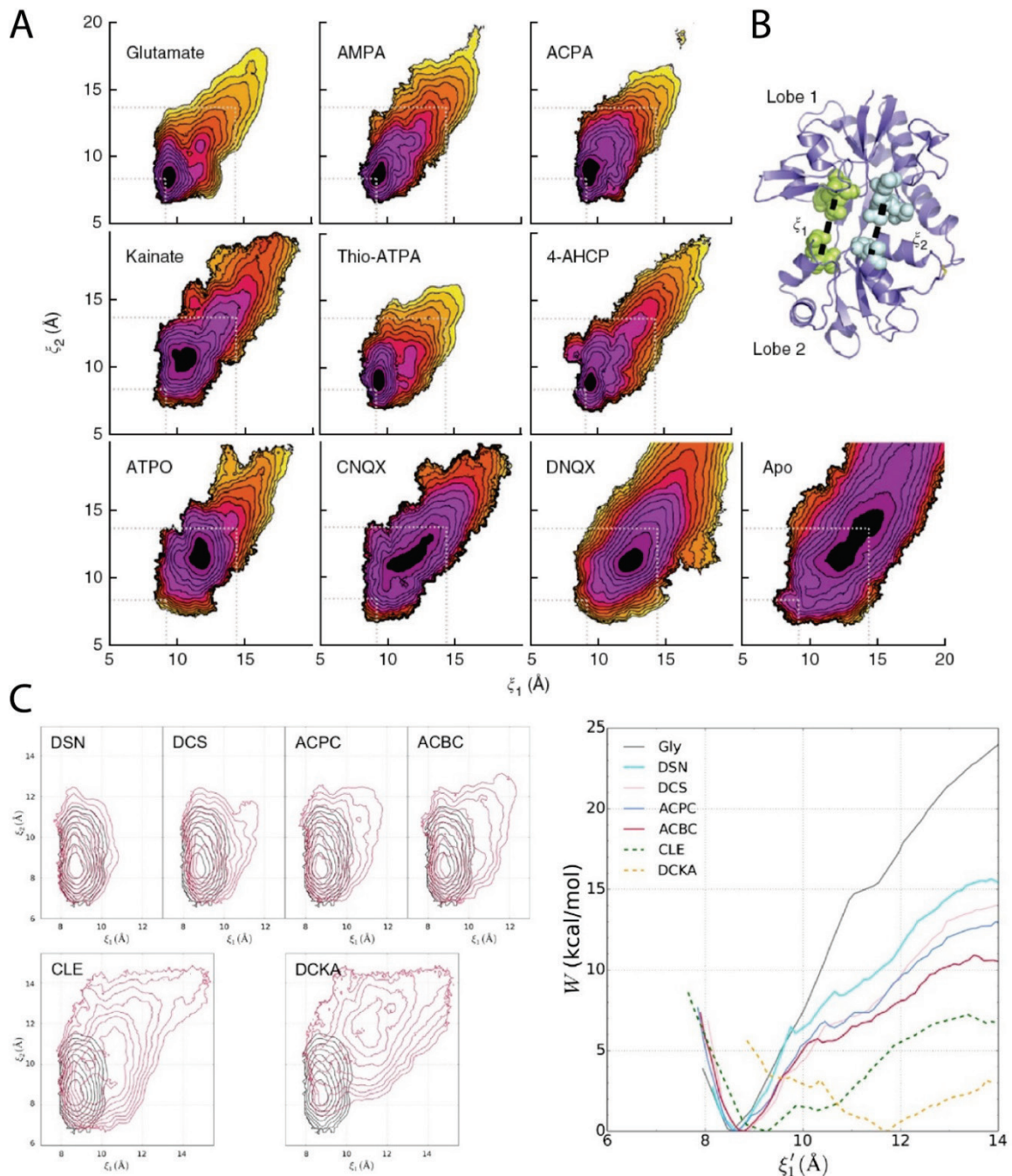
Les techniques de simulations de dynamique moléculaire ont d'abord été appliquées à des domaines isolés, pour lesquels de nombreuses structures dans différentes conformations sont disponibles depuis longtemps, et qui sont de plus petite taille que les récepteurs complets (Postila et al. 2011, Okada et al. 2012). Elles ont permis d'étudier l'interaction des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  avec l'interface du dimère ABD des récepteurs kainate (Vijayan et al. 2009) et le positionnement et la mobilité des molécules d'eau dans la crevasse (Vijayan et al. 2010, Sahai and Biggin 2011). En utilisant des domaines isolés, des simulations décrivant l'énergie libre du domaine de liaison de l'agoniste en fonction de son angle d'ouverture ont permis de montrer comment la liaison des agonistes change le paysage énergétique de cette région (Figure 1.6-2), et en particulier comment les agonistes stabilisent la forme fermée de l'ABD comparée aux antagonistes qui stabilisent la forme ouverte, les agonistes partiels stabilisant des conformations intermédiaires (Lau and Roux 2011). En effet, il a été montré pour les récepteurs AMPA que l'efficacité d'un ligand est directement reliée au degré de fermeture de l'ABD stabilisé qu'il stabilise (Armstrong and Gouaux 2000). Cette affirmation basée sur les structures cristallographiques n'est pas transposable aux récepteurs NMDA ce que l'on retrouve en simulation de dynamique moléculaire (Figure 1.6-2). Les minima

énergétiques des agonistes totaux et partiels sont les mêmes dans les paysages énergétiques des récepteurs NMDA, seules les pentes qui y mènent diffèrent (Dai and Zhou 2013, Dai and Zhou 2015). L'application de cette même technique a également permis d'éclairer l'interprétation de données obtenues avec des domaines de liaison de l'agoniste fermés de façon constitutive par des ponts disulfures en montrant que des conformations semi-ouvertes étaient encore accessibles à ces domaines même pontés (Blanke and VanDongen 2008, Kussius and Popescu 2010, Dai and Zhou 2016).

Au-delà du changement conformationnel du seul ABD isolé, des simulations ont été utilisées pour tenter de relier la fermeture de ce domaine à l'ouverture du canal sur les récepteurs AMPA et NMDA. La situation est alors plus complexe, avec la nécessité de simuler un domaine transmembranaire au sein d'une membrane. À titre d'exemple, dans le cas du récepteur NMDA, les simulations mettent en jeu 91422 molécules d'eau (solvant explicite), 266 molécules de  $\text{Na}^+$  et 258 molécules de  $\text{Cl}^-$  tandis que la membrane est représentée par 686 molécules lipidiques d'une bicouche de phosphatidylcholine (POPC). Le système total présente 380000 atomes environ. La fermeture du domaine de liaison de l'agoniste a été forcée par l'utilisation de simulation de dynamique moléculaire ciblée ('targeted molecular dynamics simulation') afin d'observer les conséquences de cette fermeture au niveau du pore (Figure 1.6-3). La conformation des linkers qui relient le domaine de liaison de l'agoniste au domaine transmembranaire est cruciale dans la transduction du changement conformationnel (Dong and Zhou 2011, Dai and Zhou 2013). Pour l'étude concernant le récepteur NMDA, il est important de noter qu'aucune structure complète de ce récepteur n'était disponible à l'époque de la parution. Le domaine transmembranaire, les linkers et l'arrangement des ABDs ont donc dû être modélisés par homologie avec le récepteur AMPA (dans ces simulations, les domaines NTDs ne sont pas considérés) pour lequel l'équipe était parvenue à modéliser une ouverture. Les structures parues après coup ont révélé des différences substantielles dans l'arrangement de la couche ABD entre récepteur AMPA et NMDA (voir 1.4.2 et Figure 1.4-5). Les conclusions de ces études coïncident avec les résultats expérimentaux, qui avancent un déplacement latéral plus important pour les sous unités en position B/D c'est-à-dire les sous-unités GluN2 chez le récepteur NMDA (Kazi et al. 2013, Kazi et al. 2014). Ainsi, l'ensemble de ces données



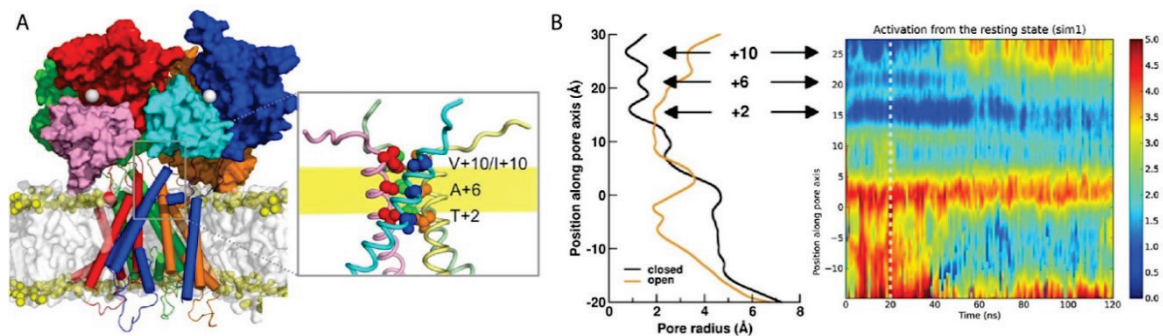
computationnelles, structurales et fonctionnelles montre une contribution différente des sous-unités A/C et B/D à l'ouverture du canal (Zhou 2017) et a abouti à la production d'un modèle mathématique de l'ouverture des récepteurs-canaux du glutamate (Dai et al. 2015).



**Figure 1.6-2 : Distribution d'énergie libre des ABDs des récepteurs canaux du glutamate en fonction de leur conformation.**

**A** Paysage d'énergie libre associé à la fermeture des ABDs de la sous-unité GluA2 du récepteur AMPA calculé à partir de simulations de dynamique

moléculaire tout atome par échantillonnage parapluie dans un solvant explicite, en fonction du ligand utilisé. Le glutamate est le ligand endogène (agoniste total), le CNQX est un antagoniste (inhibiteur compétitif), le kainate est un agoniste partiel et la mention Apo désigne la forme non liée du domaine. On remarque que le minimum d'énergie libre se déplace en fonction du ligand utilisé. **B** Représentation des deux paramètres utilisés pour quantifier la fermeture de l'ABD sur la structure de l'ABD ouvert (1FTO). **C** Dans le cas du domaine ABD de la sous-unité GluN1 du récepteur NMDA, le minimum du paysage énergétique reste le même pour les agonistes totaux et partiels, seule la pente qui conduit à ce minimum varie (Le DCKA, inhibiteur compétitif a un minimum différent). Elle est plus raide pour l'agoniste total, la glycine, que pour les agonistes partiels (Lau and Roux 2011, Dai and Zhou 2013, Dai and Zhou 2015).



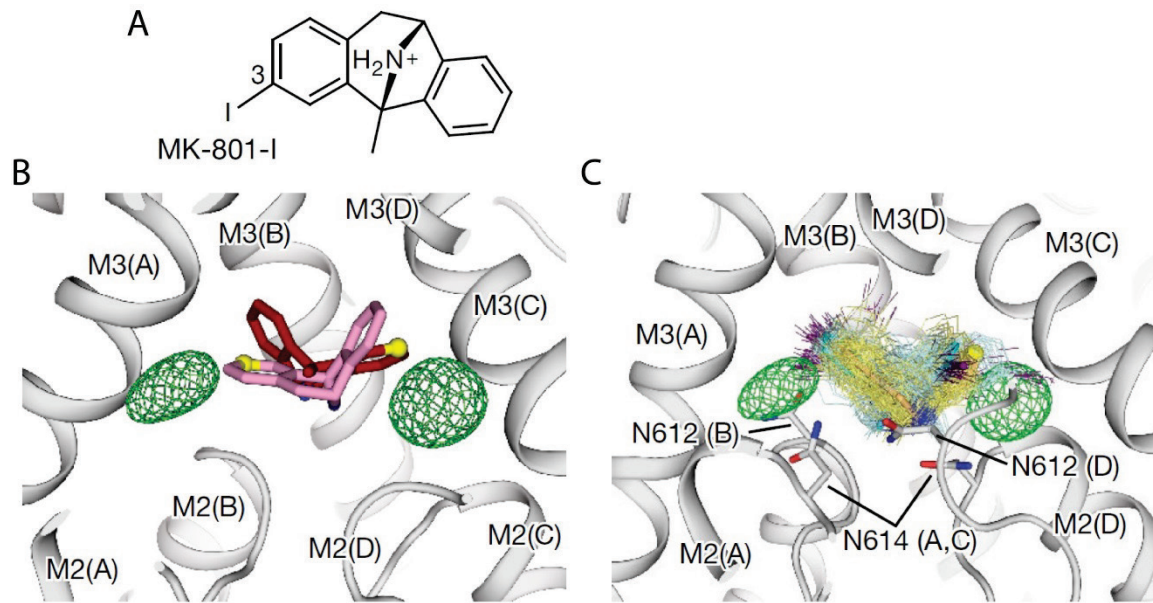
**Figure 1.6-3 : ‘Targeted molecular dynamics simulation’ du mécanisme d’ouverture du récepteur NMDA.**

**A** Modèle du récepteur NMDA construit par homologie avec le récepteur AMPA montrant les quatre domaines ABD en représentation surface et les hélices du domaine transmembranaire avec des cylindres. Le détail de la porte d’activation est donné à droite. **B**. À gauche, rayon du canal le long de l’axe du pore à  $t = 20$  ns lorsque le récepteur est fermé en noir et à  $t = 72.3$  ns en orange. Les difficultés liées à la qualité du modèle de départ sont notables, par exemple au niveau du filtre de sélectivité. Le changement dirigé de conformation de l’ABD est réalisé en 20 ns entre les instants  $t = 20$  et  $t = 40$  ns. Avant, l’ABD est en conformation ouverte. Après, il est maintenu en conformation fermée et on laisse le reste de la structure évoluer. À droite, évolution du rayon du pore pendant la simulation. On note une tendance à l’ouverture au niveau de la porte d’activation (Dai and Zhou 2013).

Le domaine transmembranaire isolé du récepteur NMDA a également fait l'objet de simulations de dynamique moléculaire visant à comprendre ses propriétés de liaison des ions magnésium et calcium (Mesbahi-Vasey et al. 2017). Dans cette étude, de la même façon que dans l'étude citée dans la partie 1.6.1 où les auteurs tentent de produire un TMD ouvert (Pang and Zhou 2017), un modèle par homologie a tout d'abord été produit mais il a ensuite été soumis à des simulations de dynamique moléculaire afin d'en améliorer la qualité. Le modèle tout atome résultant est en bonne adéquation avec la structure parue peu après.

Enfin, tout récemment, la résolution détaillée du domaine transmembranaire du récepteur NMDA emprisonnant le bloqueur de pore MK-801 a permis d'étudier le blocage du pore par simulation de dynamique moléculaire. Le positionnement du MK-801 et de la mémantine dans le pore ainsi que leurs trajectoires pour y entrer ont été analysés (Figure 1.6-4). Ces molécules, qui se lient au niveau du vestibule interne, entre la porte d'activation ('gate') et le filtre de sélectivité, agissent à la fois par occlusion physique du trajet des ions et en favorisant la fermeture du canal par un effondrement des hélices qui le bordent sur la partie hydrophobe du bloqueur (Song et al. 2018).

L'accélération récente du rythme de parution de nouvelles structures de protéines membranaires complètes grâce au développement de la cryo-microscopie électronique est une source de données valorisable par la réalisation de simulations de dynamique moléculaire moyennant les ressources computationnelles correspondantes. En prenant l'exemple du récepteur NMDA, GluN1 et GluN2 ayant des tailles d'environ 900 et 1400 acides aminés respectivement, le tétramère complet possède environ 6400 acides aminés. Un tel système représente environ  $10^5$  à  $10^6$  atomes en incluant le solvant et les lipides (Zheng et al. 2017). En 2009, une machine unique pouvait en un jour de calcul simuler l'évolution d'un tel système pendant au maximum 10 ns (Klepeis et al. 2009). La parallélisation des calculs, l'augmentation de la puissance computationnelle et la meilleure optimisation des champs de force et algorithmes laissent donc présager de nouvelles études de dynamique moléculaire sur récepteur entier, permettant d'étudier à la fois l'activation et la modulation allostérique avec des modèles plus exacts que ceux utilisés jusqu'à maintenant (Moraes et al. 2014, Vinothkumar 2015).



**Figure 1.6-4 : Étude du mode de liaison du MK-801 par simulation de dynamique moléculaire.**

**A** Formule topologique du MK-801, un bloqueur du canal ouvert. **B** Position de la molécule de MK-801 dans la structure en rouge avec l'anomalie de densité due à l'atome d'iode en vert. Un deuxième positionnement de la molécule par pseudo-symétrie d'ordre 2 est montré en rose. L'atome de carbone qui porte l'iode en position 3 est montré en jaune. **C** Positionnement du MK-801 au cours d'une simulation de dynamique moléculaire démarrée avec la molécule 'dockée' (amarrée) sur son site de liaison. On remarque que les mouvements des atomes d'iode (en violet) sont regroupés en deux populations qui coïncident avec la localisation des anomalies de densité. L'atome d'iode est stabilisé par une liaison hydrogène avec GluN1-N614 et GluN2B-N612. La simulation a été réalisée dans une membrane lipidique de POPC à pH 7, à 310 K, dans un ensemble NPT avec Anton et le champ de force CHARMM, le système contenant environ 507000 atomes (Song et al. 2018).

### 1.6.3. L'analyse en mode normaux

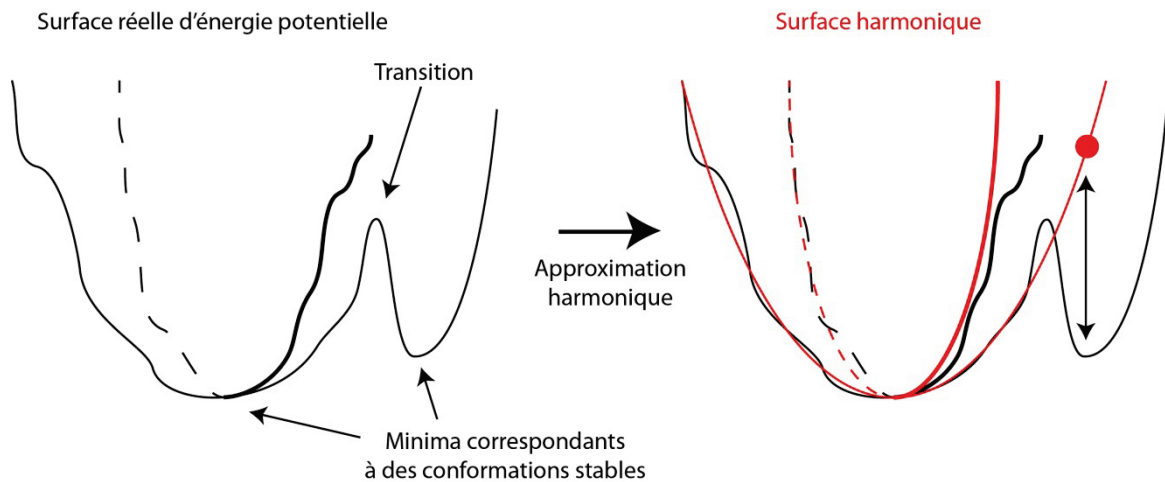
#### 1.6.3.1. Principe

La simulation de dynamique moléculaire est une technique poussée qui peut être difficile à mettre en œuvre, notamment parce qu'elle est couteuse en termes de ressources computationnelles, particulièrement sur les échelles de temps suffisamment

longues pour observer des changements fonctionnels de grande ampleur et sur des systèmes de très grande taille comme les récepteurs canaux du glutamate. Lorsque l'on cherche à observer des mouvements globaux au sein d'une protéine, sans rechercher une précision de l'échelle des mouvements atomiques, l'analyse en modes normaux est une bonne solution, moins demandeuse en temps de calcul et puissante pour sonder les mouvements à grande échelle des macromolécules (Cui and Bahar 2006).

Cette technique repose sur l'utilisation d'une approximation harmonique qui est valable si l'on se place à un minimum d'énergie potentielle de la protéine. On considère alors que le potentiel a la forme d'une fonction harmonique (Figure 1.6-5). En analyse par modes normaux, au lieu de chercher une solution numérique d'équations définissant le potentiel au cours du temps, on s'affranchit de la dimension temporelle pour chercher une solution analytique du mouvement de la protéine en utilisant un potentiel approximatif. Le mouvement de la protéine est alors une somme de vibrations, les vibrations de plus basse fréquence représentant les mouvements globaux, de grande ampleur, qui concernent de grandes parties de la protéine et qui ont le plus de chance de révéler des couplages entre domaines tandis que les vibrations de hautes fréquences correspondent à des mouvements locaux.

Grâce à l'approximation harmonique, le problème prend la forme d'une matrice Hessienne du potentiel, c'est-à-dire la matrice des dérivées partielles secondes du potentiel par rapport à chacune des coordonnées du système. Cette matrice est d'ordre  $3N$ ,  $N$  étant le nombre d'atomes du système, chaque atome ayant trois coordonnées. La résolution du problème, qui passe par la diagonalisation de la matrice, permet de trouver les vecteurs propres qui correspondent à la direction des différentes vibrations tandis que les valeurs propres correspondent à la fréquence de ces vibrations. Les 6 mouvements de plus basses fréquence sont dit 'triviaux' car ils correspondent à la translation et à la rotation de la protéine entière. Les différentes vibrations obtenues sont par définition orthogonales les unes par rapport aux autres.



**Figure 1.6-5 : Utilisation de l'approximation harmonique pour l'analyse de modes normaux.**

À gauche, représentation simplifiée de la surface d'énergie potentielle multidimensionnelle d'une protéine au niveau d'un minimum. On a représenté une transition vers une autre conformation de faible énergie. À droite, on constate que l'approximation harmonique ne permet pas dans ce cas de trouver la deuxième conformation de faible énergie malgré une bonne représentation des mouvements à proximité du minimum. Un déplacement sur la surface harmonique en utilisant les modes de faible fréquence suivi d'une minimisation permettrait de résoudre ce problème.

### 1.6.3.2. Différents champs de force

L'approximation harmonique n'est valable que si l'on se place à un minimum d'énergie potentielle. Dans le cas d'un champ de force élastique, où les interactions sont modélisées par des ressorts, on se trouve à un minimum d'énergie potentielle « par construction » en définissant la longueur d'équilibre des ressorts à leur longueur de départ. Les modèles élastiques sont les moins coûteux en termes de puissance de calcul et il a été montré qu'ils permettent une bonne représentation des mouvements à grande échelle qui animent les protéines. (Tirion 1996, Sanejouand 2013). Le recours à un système gros-grain permet de simplifier encore le problème considéré. Du fait de l'approximation supplémentaire utilisée dans un champ de force élastique, les fréquences obtenues ne sont plus réalistes.

Dans le cas de l'utilisation d'un champ de force de mécanique moléculaire<sup>1</sup> pour le calcul des modes normaux, il faut optimiser la structure de départ pour trouver un minimum d'énergie potentielle du champ de force utilisé ce qui constitue une étape supplémentaire. Quand le gradient d'énergie n'est pas infinitésimal au voisinage de la structure de départ, on obtient des valeurs propres négatives lors de la diagonalisation de la matrice Hessienne qui correspondent à des fréquences de vibration imaginaires.

Par ailleurs, lorsque l'on se sert des modes normaux pour simuler les mouvements de la protéine, il faut garder à l'esprit que, plus l'on s'éloigne de la structure de départ, plus on risque d'être inexact du fait de la nécessité d'être proche d'un minimum d'énergie potentielle.

### ***1.6.3.3. Application aux récepteurs ionotropiques du glutamate***

Comme les autres méthodes de modélisation, l'analyse en modes normaux a d'abord été utilisée sur des domaines isolés des récepteurs-canaux du glutamate, non seulement parce que les données structurales ont été disponibles plus tôt que pour le récepteur entier, mais aussi car ils forment des systèmes plus petits et donc plus faciles à modéliser (Dutta et al. 2012, Zhu et al. 2013). Cependant, l'analyse en mode normaux est particulièrement intéressante pour les récepteurs entiers car ce sont de gros systèmes. Au niveau des domaines isolés, l'analyse en mode normaux a permis de démontrer que les domaines de type 'clamshell' étaient animés de deux principaux types de mouvements (Figure 1.6-6) :

- Un mouvement d'ouverture/fermeture, classique pour des domaines de type VFT ('Venus fly trap', domaines bilobés en 'clamshell') qui lient leur ligand dans la poche interlobe mais qui a pu être généralisé pour les domaines NTD des récepteurs-canaux du glutamate qui n'ont pas forcément de ligand ou dont le

---

<sup>1</sup> Pour les calculs de modes normaux, on peut aussi se servir des champs de force de type CHARMM, AMBER, etc. qui sont ceux présentés dans la partie sur les simulations de dynamique moléculaire (voir 1.6.2.2). Dans les parties concernant l'analyse en mode normaux, nous les appellerons « champs de force de mécanique moléculaire », par opposition aux « champs de force élastiques » (Bertaccini et al. 2007).

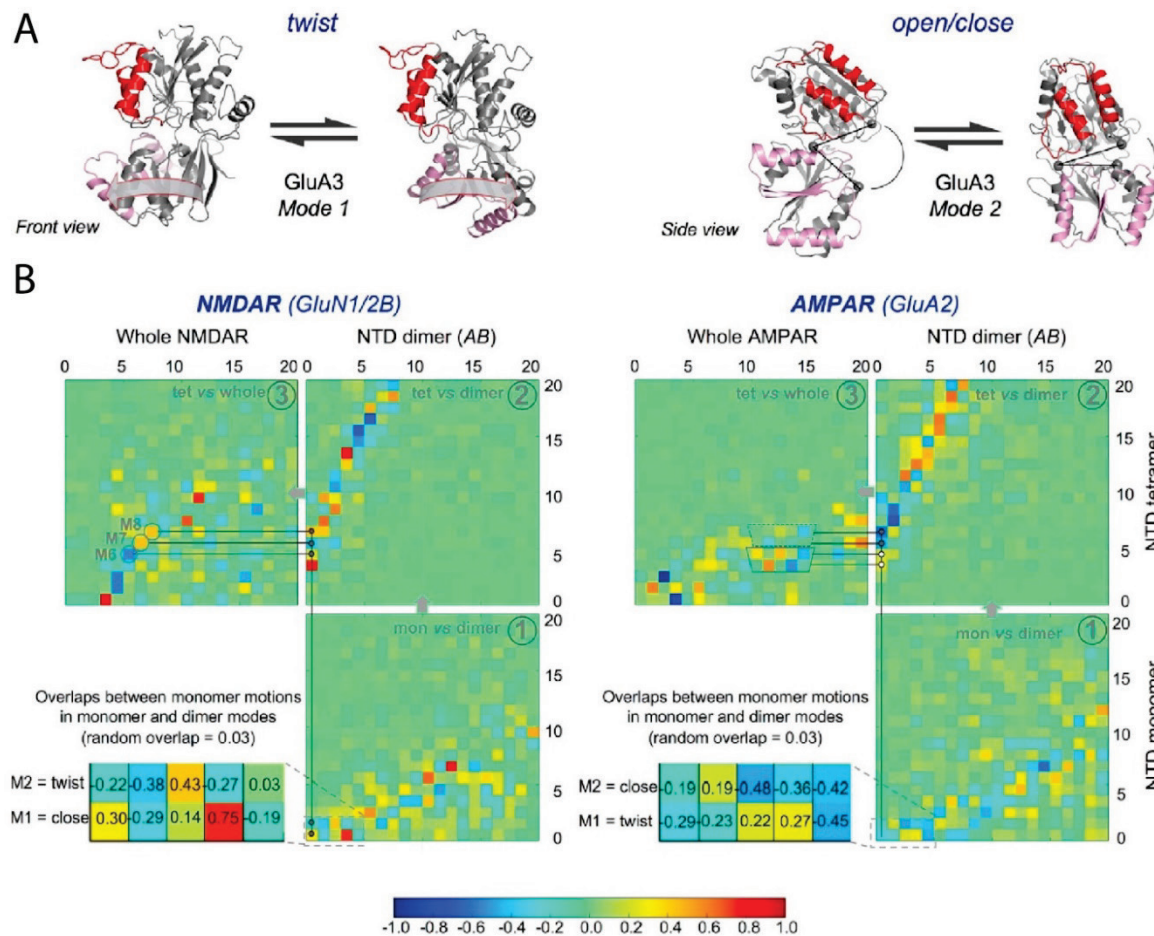
ligand ne se lie pas forcément dans la poche interlobe (cas de l'ifenprodil par exemple). De plus, les NTDs de récepteurs NMDA possèdent une conformation twistée différentes de celles des autres domaines VFT.

- Un mouvement de twist/détwist entre les deux lobes qui n'avait pas été anticipé. Ce mouvement correspond à une modification de l'orientations relative des deux lobes l'un par rapport à l'autre.

Les mouvements correspondants à ces deux principaux modes de vibration des domaines 'clamshell' correspondent à des déplacements dont l'importance fonctionnelle a été démontrée. Les mouvement d'ouverture/fermeture des NTDs ont été reliés à l'activité du récepteur avec des domaines ouverts favorisant un récepteur actif et des domaines fermés favorisant un récepteur inactif (voir Figure 1.4-12) (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2011) tandis que les mouvements de twist/détwist ont également pu être piégés expérimentalement (Stroebel et al. 2011, Zhu et al. 2013). Par ailleurs, une fois les structures complètes parues, il a pu également être vérifié que ces mouvements identifiés sur des domaines isolés étaient retrouvés par analyse de modes normaux sur le récepteur entier (Dutta et al. 2015, Krieger et al. 2015).

L'analyse en modes normaux a également été utilisée au niveau des ABDs des récepteurs AMPA : le passage de la conformation classique à la conformation « d'angle fermé » ('closed angle' ou CA), obtenue par cristallisation d'un tétramère d'ABDs comportant des cystéines introduites afin d'obtenir des pontages, se fait simplement par l'utilisation du mode de vibration de plus basse fréquence (Lau et al. 2013). Ce résultat, accompagné de preuves fonctionnelles démontre l'importance de cette conformation mais il n'a pas été reproduit dans le cadre du récepteur entier. En suivant cet exemple, l'analyse en mode normaux permettrait peut-être d'aider à déterminer l'importance relative des nombreuses conformations inattendues proposées récemment pour les couches ABD et NTD des récepteurs-canaux du glutamate. La plupart de ces conformations ont été avancées à partir de données structurales et les données fonctionnelles ou computationnelles leur font défaut (Chen et al. 2014, Durr et al. 2014, Meyerson et al. 2014, Yelshanskaya et al. 2014, Herguedas et al. 2016, Meyerson et al. 2016, Zhu et al. 2016).





**Figure 1.6-6 : L'ouverture/fermeture et le twist/détwist : deux principaux modes de vibration des domaines 'clamshell'.**

**A** Présentation des deux types de mouvement sur le domaine NTD de GluA3.  
**B** Matrice comparant les modes de vibrations des NTD isolés avec des systèmes de taille de plus en plus grande : le dimère de NTD, puis le tétramère de NTD, puis le récepteur entier. Les couleurs les plus sombres représentent les corrélations les plus importantes, le rouge et le bleu sont équivalents. On remarque par exemple que les mouvements d'ouverture et de twist du NTD de GluN1 isolé sont retrouvés dans le mode 1 au niveau du dimère, puis dans les modes 5 à 7 au niveau du tétramère de NTD et enfin dans les modes 6 à 8 du récepteur entier (Krieger et al. 2015).

En appliquant l'analyse par modes normaux de façon comparative aux récepteurs AMPA et NMDA entiers, une étude a avancé qu'il était possible d'inter-convertir la conformation de ces deux récepteurs à l'arrangement structural distinct (voir Figure 1.4-6). En utilisant les modes de basses fréquences, on pourrait passer de l'arrangement

aéré du récepteur AMPA à l'arrangement compact du récepteur NMDA et inversement (Dutta et al. 2015). Une faiblesse de ce travail réside néanmoins dans le fait que lors des comparaisons entre les deux sous-types de récepteur, les auteurs ne conservent que les acides aminés d'une structure qui ont un équivalent dans l'autre structure ('core receptor') ce qui a pour défaut de gommer beaucoup de différences structurales, notamment toutes les boucles qui sont spécifiques à l'un des sous-type. En accord avec ce parti-pris, les parties manquantes des récepteurs dans les structures ne sont pas reconstruites ce qui d'un côté est une limitation étant donnée l'importance des différents linkers inter-couche chez les récepteurs-canaux du glutamate, mais d'un autre côté présente l'avantage de ne baser la modélisation que sur des données structurales expérimentales en évitant les éventuelles erreurs de reconstructions *ab initio*.

Plus récemment, une étude basée sur un réseau élastique a cherché à tirer profit de la parution récente de nouvelles densités de cryo-microscopie électronique du récepteur NMDA pour analyser les changements de conformation du récepteur (Zheng et al. 2017). Par l'analyse de la transition conformationnelle entre une forme inhibée et une forme active du récepteur avec un 'fitting' flexible, les auteurs proposent que le passage d'une forme à l'autre se fait de façon séquentielle avec des mouvements d'abord dans la couche NTD, puis dans la couche ABD et enfin au niveau du domaine transmembranaire. Malheureusement, la transition modélisée n'aboutit pas à l'ouverture du pore dans la forme active finale.

Les études d'analyse par modes normaux des récepteurs ionotropiques du glutamate ont montré leur efficacité sur des domaines isolés du récepteur ce qui est prometteur pour les résultats obtenus sur le récepteur entier, même si les données fonctionnelles qui permettraient d'évaluer la pertinence des propositions qui ont été faites grâce à cette technique manquent encore.



## **2. Résultats**

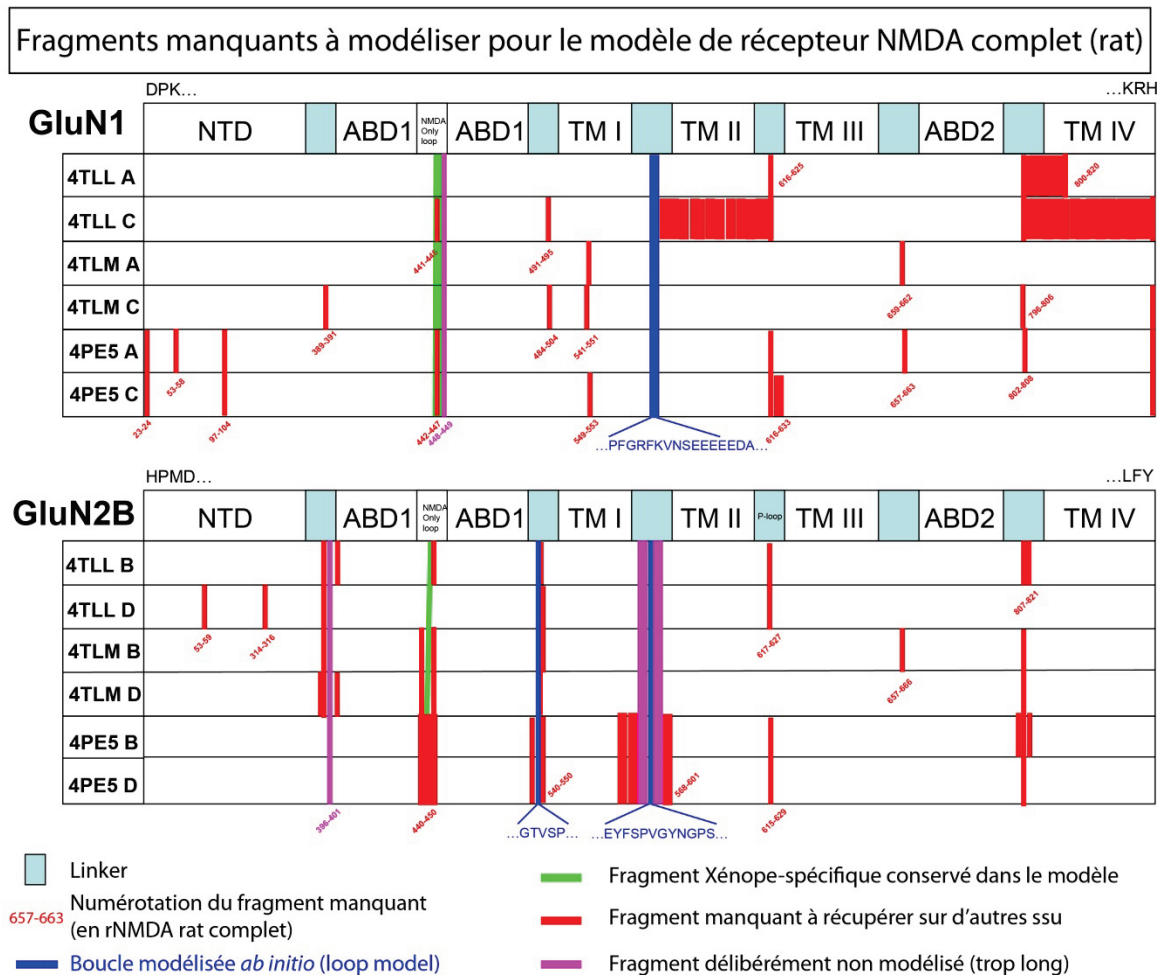
## **2.1. Analyse des modes normaux du récepteur NMDA entier**

### **2.1.1. Contexte**

Les changements de conformation des domaines NTD du récepteur NMDA, à la fois spontanés et stabilisés par des modulateurs allostériques, sont connus (voir Figure 1.4-12, Mony et al. 2011). Cependant, le mécanisme par lequel ces changements conformationnels de la couche NTD affectent l'activité du récepteur en agissant sur la machinerie d'ouverture (couches ABD et TMD) reste obscur. La parution des structures quasi-complètes des récepteurs NMDA, en 2014 a ouvert la voie aux études computationnelles du récepteur entier avec l'espoir de répondre à cette question (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014). Étant donné la taille du récepteur, l'analyse des modes normaux est une technique susceptible de livrer des informations sur les couplages allostériques permettant aux domaines NTD de contrôler l'activité du canal.

Les structures parues en 2014 représentent le récepteur dans sa conformation inhibée par un modulateur allostérique qui se fixe à l'interface entre les deux domaines NTD (ifenprodil ou Ro25-6981 qui ont le même mécanisme d'action, voir 1.4.4.2). Malgré l'utilisation de séquences de deux espèces différentes, Xénope et rat, les deux structures publiées sont remarquablement similaires ce qui soutient leur justesse. Cependant, certains fragments sont manquants. Un modèle complet de récepteur NMDA a été produit au laboratoire sur la base de ces deux structures. La séquence des gènes sauvages de rat a été utilisée afin de se replacer dans un contexte aussi proche que possible des conditions expérimentales (utilisation de gènes de mammifères, souris et rat). Il a donc fallu procéder par homologie pour remplacer les acides aminés divergents

ou mutés dans les structures. De plus certaines boucles non résolues dans les structures ont dues être soit omises, soit modélisées *ab initio* si elles étaient indispensables.



**Figure 2.1-1 : Conception d'un modèle de récepteur NMDA de rat complet.**

Présentation des informations structurales disponibles pour la sous-unité GluN1 et pour la sous-unité GluN2B, sur les 3 fichiers pdb parus en 2014. Les zones en rouge signalent les données manquantes. La combinaison d'informations provenant des deux exemplaires de chaque sous-unité dans chaque structure a permis dans la plupart des cas la reconstruction du récepteur de rat par homologie. Certaines boucles, en rose ou en bleu, ont cependant dues être omises ou modélisées *ab initio*.

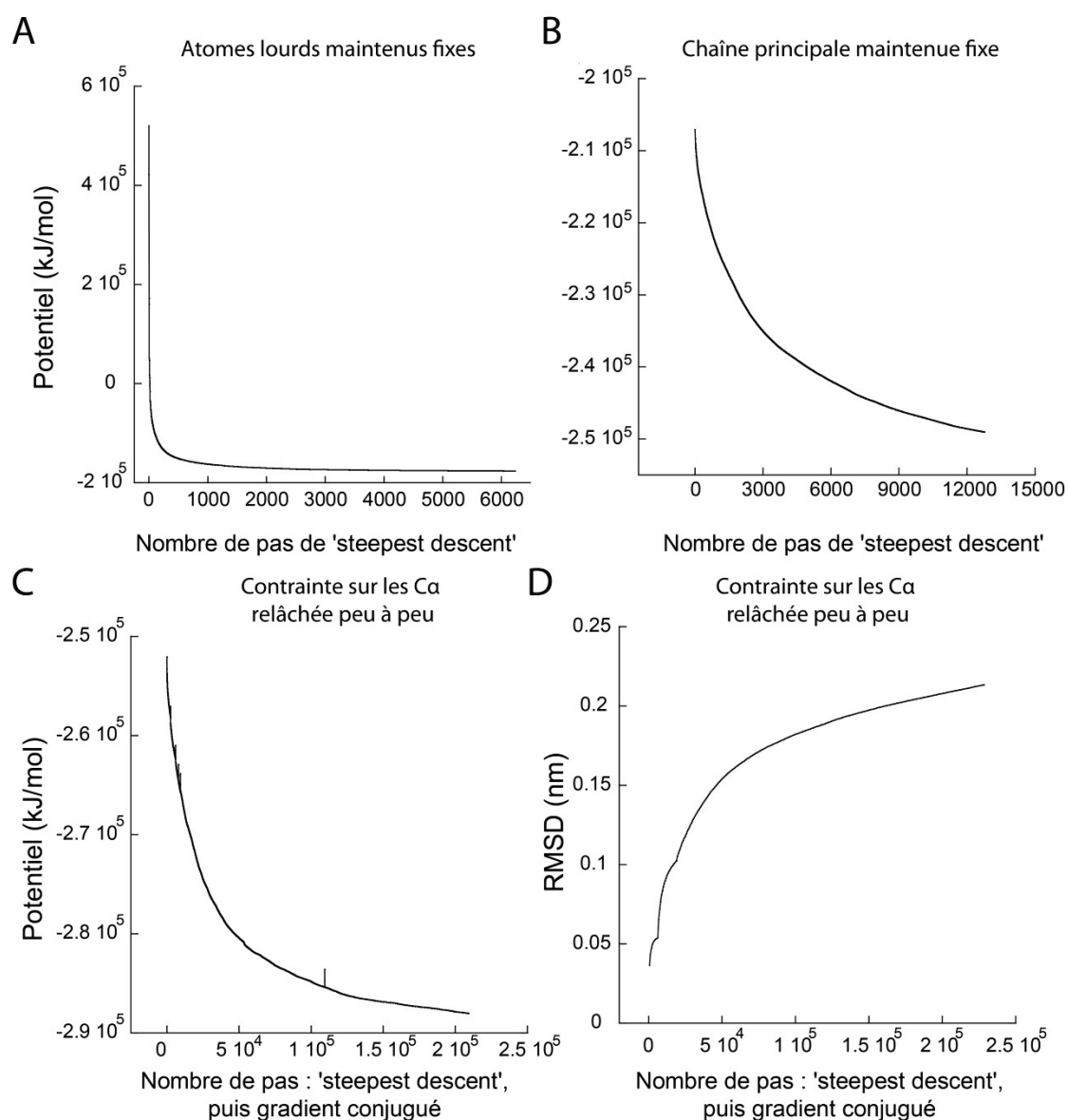
### 2.1.2. Utilisation d'un champ de force tout-atome avec Gromacs

L'existence d'une étude parvenant à calculer les modes normaux du récepteur pentamérique à la glycine  $\alpha 1$  dans un champ de force « de mécanique moléculaire » (voir note de bas de page p. 122) tout atome nous a encouragé à tenter cette technique (Bertaccini et al. 2007). Le modèle utilisé dans cet article, de plus de 26000 atomes, est de taille comparable au récepteur NMDA (50000 atomes). L'avantage d'une telle technique par rapport à un modèle gros grains réside dans la possibilité d'examiner l'effet de petites molécules sur les mouvements de grande ampleur de la protéine. En effet, un champ de force de mécanique moléculaire tout atome permet de rendre compte d'effets locaux subtils dans les interactions inter-atomiques. De plus les réseaux élastiques sont figés et ne permettent généralement pas la rupture des liaisons faibles dans la mesure où les ressorts utilisés pour les représenter sont « incassables ». Enfin, un champ de force de mécanique moléculaire permet d'avoir une estimation réaliste des fréquences de vibration des différents modes ce qui n'est pas le cas avec un modèle élastique. La mémoire vive nécessaire pour réaliser une étude des modes normaux d'une protéine dans un champ de force de mécanique moléculaire croît en  $n^2$  avec  $n$  le nombre d'atomes du fait de l'étape de diagonalisation de la matrice Hessienne lors de la résolution du problème. Néanmoins, lorsque l'on prend en compte le fait que la matrice est creuse, la mémoire nécessaire n'est plus que proportionnelle au nombre d'atomes. C'est cette stratégie qui a été utilisée sur le récepteur pentamérique  $\alpha 1$ .

La grappe de serveurs de calcul ('cluster') de l'Institut de Biologie de l'ÉNS possède des nœuds dont la mémoire vive est de 64 GB. C'est l'un de ces nœuds qui a été utilisé spécifiquement pour l'analyse en mode normaux du récepteur NMDA complet dans un champ de force de mécanique moléculaire. Comme pour l'étude du récepteur pentamérique, nous avons choisi le logiciel GROMACS pour notre étude (Van Der Spoel et al. 2005, Bertaccini et al. 2007). La première étape, obligatoire avant de passer au calcul des modes normaux, consistait alors à minimiser notre modèle (Figure 2.1-2). Malheureusement, malgré de multiples tentatives, nous ne sommes pas parvenus à minimiser suffisamment notre modèle : à chaque essai de calcul des modes normaux, les

valeurs propres obtenues étaient négatives. D'une part, il est possible que le modèle ne soit pas de qualité suffisante pour effectuer la minimisation de façon satisfaisante. D'autre part, les seuls algorithmes de minimisation disponibles avec GROMACS sont la méthode de la plus grande pente ('steepest descent') et la méthode du gradient conjugué ('conjugate gradient'). La première, utilisée en début de minimisation pour sa rapidité de convergence, est très sensible aux minima locaux. La seconde pour laquelle chaque pas de minimisation est réalisé de façon orthogonale au précédent converge moins rapidement mais est moins sensible aux minima locaux. Les protocoles de minimisation mis en place à partir de ces deux algorithmes ne nous ont pas permis de minimiser suffisamment notre structure. Un algorithme de minimisation de type Newton-Raphson, absent chez GROMACS, nous aurait peut-être permis d'arriver à un meilleur résultat. Le fait que nous soyons parvenus à diagonaliser la matrice Hessienne malgré sa grande dimension montre que nos hypothèses de départ sur la faisabilité de modéliser un récepteur NMDA entier en champs de force de mécanique moléculaire étaient exactes.





**Figure 2.1-2 : Tentative de minimisation du récepteur NMDA complet dans un champ de force de mécanique moléculaire avec GROMACS.**

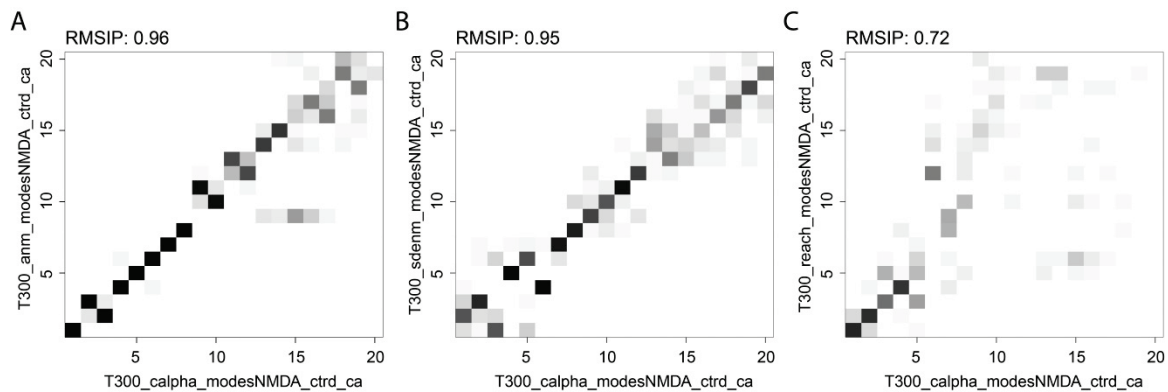
**A-B** Évolution du potentiel en fonction du nombre de pas de 'steepest descent' dans la première étape du protocole de minimisation où les atomes lourds sont maintenus fixes (A) et dans la deuxième étape du protocole où seule la chaîne principale est maintenue (B). **C** Évolution du potentiel en fonction du nombre de pas de 'steepest descent', puis de gradient conjugué dans les dernières étapes du protocole de minimisation où une contrainte de position sur les C $\alpha$  est relâchée peu à peu. A la fin de la dernière étape de gradient conjugué, il n'y a plus de contrainte de position sur les atomes et l'algorithme s'arrête en signalant qu'il a convergé. **D** Évolution du rmsd lors des dernières étapes de la minimisation.

### 2.1.3. Utilisation d'un champ de force élastique avec Bio3D

Suite à nos tentatives avec GROMACS, nous avons décidé de passer à un modèle élastique plus facile à mettre en œuvre. Après des essais sur différents programmes (ANM 2.0 (Eyal et al. 2015); PDBMAT, DIAGRTB et eINémo (Suhre and Sanejouand 2004)), nous avons opté pour l'utilisation de Bio3D (Grant et al. 2006, Skjaerven et al. 2014), paquet pour le langage de programmation R (Tippmann 2015, R-Core-Team 2018), qui présente l'avantage d'intégrer de nombreuses fonctions de manipulation et d'étude des séquences, structures et trajectoires de protéines.

En utilisant ce programme, nous avons pu observer les principaux modes de vibration de notre modèle de récepteur NMDA en utilisant les différents modèles directement implémentés :

- Le champ de force 'calpha' développé initialement par Konrad Hinsen qui applique une constante de rappel différente entre les nœuds proches (pour modéliser les interactions covalentes de la chaîne principale ou 'backbone') et toutes les autres paires (Hinsen and Kneller 1999).
- Le champ de force 'ANM' ('Anisotropic Network Model') développé par le laboratoire d'Ivet Bahar qui utilise une constante de rappel dépendante de la distance entre les nœuds (Eyal et al. 2015).
- Le champ de force 'sdENM' développé par Yves Dehouck et Alexander Mikhailov qui utilise des constantes de rappel dépendant de la nature des résidus (Dehouck and Mikhailov 2013).
- Le champ de force 'REACH' ('Realistic Extension Algorithm via Covariance Hessian') développé par Kei Moritsugu et Jeremy Smith qui emploie une constante de rappel qui décroît exponentiellement avec la distance pour les interactions non covalentes (Moritsugu and Smith 2008).

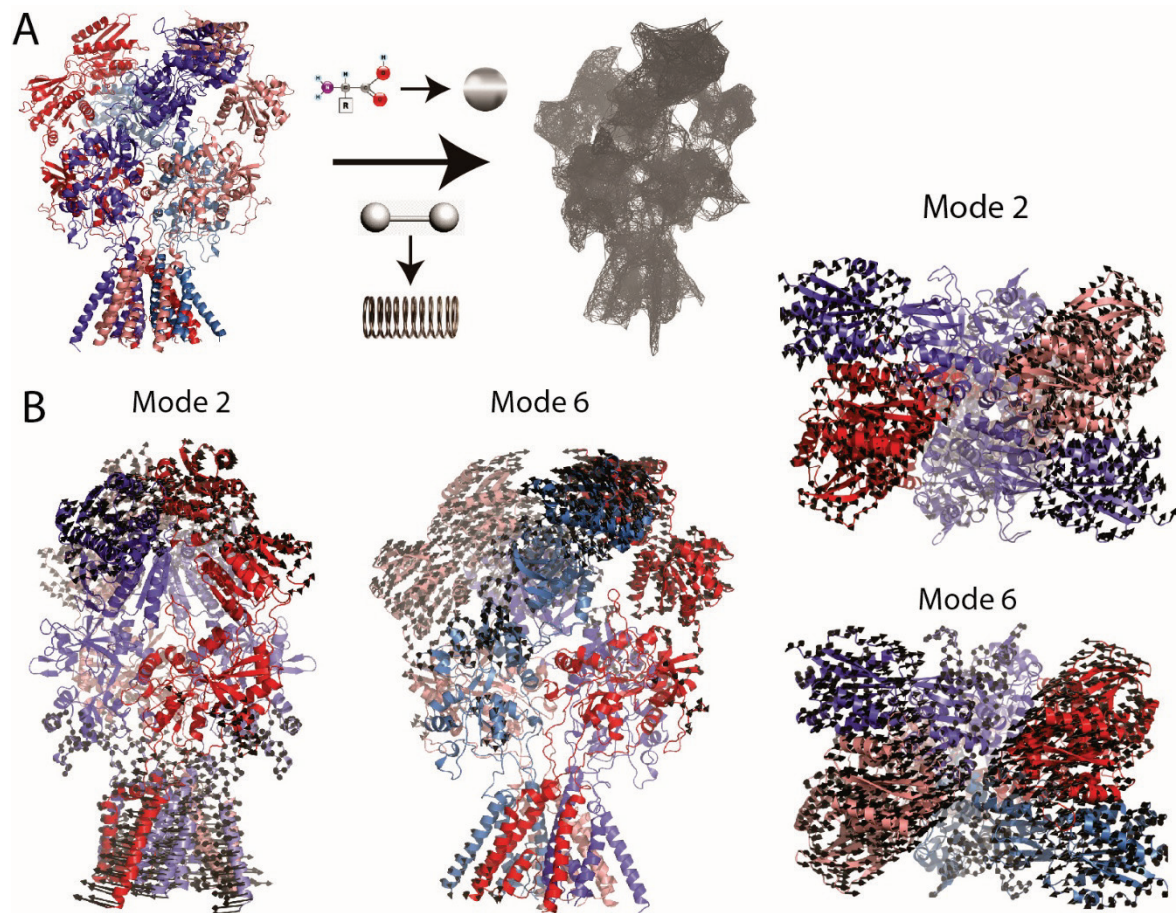


**Figure 2.1-3 : Comparaison des modes de vibration du récepteur NMDA entier dans différents champs de force élastiques.**

Comparaison entre les modes obtenus avec le champ de force calpha et le champ de force ANM en **A**, sdENM en **B** et REACH en **C**. Le RMSIP est une mesure de la similarité entre deux ensembles de modes. Plus les carrés sont sombres, plus les modes sont semblables. On note une très bonne conservation des modes de plus basses fréquences.

Une comparaison des résultats obtenus avec ces différents champs de forces élastiques nous a permis de conclure que les résultats étaient robustes et très similaires d'un modèle à l'autre. Les modes de vibration de basse fréquence obtenus étaient souvent identiques avec les différents champs de force utilisés, avec toutefois des permutations dans leur numérotation liées à des changements de fréquence (Figure 2.1-3). Certains modes obtenus avec un modèle étaient parfois décomposés dans d'autres modes de basse fréquence obtenus avec un autre modèle. Le mode de vibration numéro 1, était toujours le même et correspondait à un ploiement du récepteur ('bending'), en cohérence avec les autres études parues depuis, et dont les auteurs ont été jusqu'à proposer que ce mouvement au cours duquel le récepteur se penche sur le côté soit un mécanisme permettant aux domaines NTD de contacter des protéines membranaires auxiliaires qui protrudent moins loin hors de la cellule (Dutta et al. 2015, Krieger et al. 2015). Des rotations des différentes couches de domaines les unes par rapport aux autres sont également fréquentes (Figure 2.1-4), une donnée en cohérence pour le domaine transmembranaire avec un mécanisme d'ouverture en iris ('iris-like') comme pour d'autres canaux pentamériques et tétramériques (Jiang et al. 2002, Valadie et al. 2003, Long et al. 2005). Cette ouverture en iris a depuis été démontrée pour le récepteur AMPA et a toutes les chances d'être conservée chez le récepteur NMDA

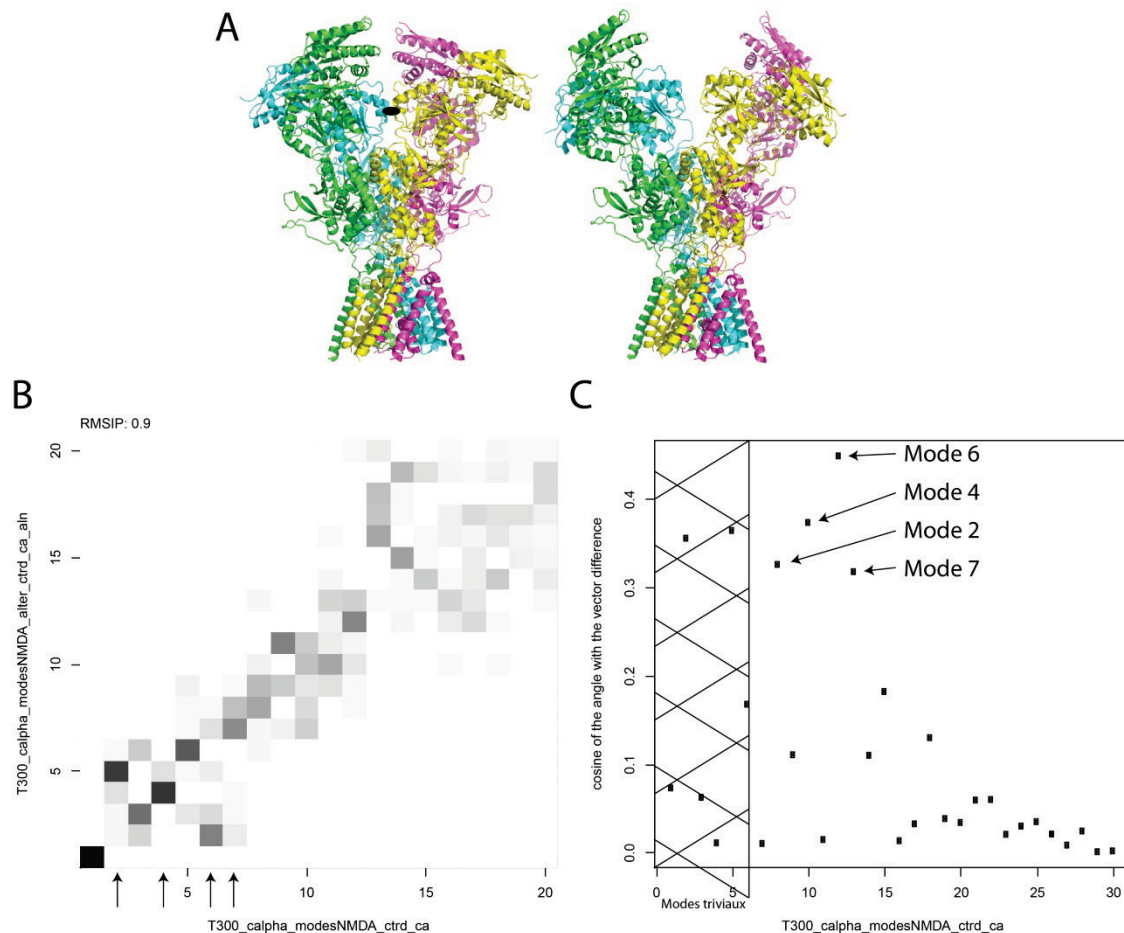
(Twomey et al. 2017a). Le mode 2 notamment, relie une modification de l'angle d'ouverture de l'ABD de GluN2B avec une telle rotation du domaine transmembranaire. Le mode 6 quant à lui met en jeu une rotation de l'ABD de type 'rolling' dont nous démontrons l'importance fonctionnelle dans la section 2.3.



**Figure 2.1-4 : Étude des modes normaux d'un récepteur NMDA complet dans un réseau élastique.**

**A** Représentation du modèle de récepteur NMDA entier par un champ de force élastique gros-grains. Les résidus sont représentés par des nœuds (utilisation d'un modèle gros grains, et les interactions entre les nœuds sont représentées par des oscillateurs harmoniques (modèle élastique). A droite, les traits représentent chacun un ressort. **B** Présentation du mode 2 et du mode 6 de vibration en vue latérale et en vue extracellulaire. Dans le mode 2, une modification de l'angle d'ouverture de l'ABD de GluN2 (flèches sur le lobe du bas) est couplée à une rotation du domaine transmembranaire et à un décalage rigide ('rigid body translation') des deux dimères de NTD. Le mode 6 couple un mouvement de rapprochement des deux dimères de NTD avec une légère rotation en 'rolling' au niveau de l'ABD.

Les structures parues en 2014 ont été obtenues grâce à l'insertion d'un pont disulfure entre les deux dimères de NTD, en position K216 de la sous-unité GluN2B chez le récepteur de *Xenopus laevis* (homologue à la position K221 dans le gène de rat utilisé habituellement en laboratoire pour cette sous-unité). Cette insertion aboutit à une moindre flexibilité au niveau des NTDs et permet d'améliorer grandement la résolution obtenue en cristallographie aux rayons X, mais avant cette insertion, une première structure de basse résolution avait été obtenue avec des NTDs non contraints (Lee et al. 2014). En contactant directement le laboratoire d'Eric Gouaux, nous avons obtenu une structure de cette deuxième conformation du récepteur inhibé pour laquelle les NTDs sont libérés de la contrainte du pont disulfure. Après avoir adapté notre modèle à cette deuxième conformation, nous avons procédé à une analyse comparative des modes des deux structures (Figure 2.1-5). En effet, les modes conservés dans les deux conformations sont plus susceptibles d'avoir une importance physiologique, particulièrement s'ils permettent de passer d'une conformation à l'autre. Les modes 2 et 6 présentés ci-dessus font partie des modes qui sont conservés dans les deux structures, comme la plupart des modes de basse fréquence. De plus, leur cosinus avec le vecteur différence des deux structures (vecteur qui permet de passer d'une conformation à l'autre) est élevé ce qui signifie qu'ils permettent de réaliser une grande partie de la transition entre les deux états. Les modes 4 et 7 présentent aussi ces deux caractéristiques. Ces deux modes présentent principalement des torsions entre les couches de domaines, mais également des mouvements de faible amplitude de twist et de bâillement des domaines NTD (chez GluN2B pour le mode 4 et chez GluN1 pour le mode 7). Le mode 4 présente par ailleurs une compaction globale du récepteur NMDA, un changement qui a été mis en relation avec son activation lors d'expériences de microscopie à force atomique (Suzuki et al. 2013).



**Figure 2.1-5 : Comparaison des modes de vibration du récepteur NMDA entier à partir de deux états conformationnels distincts de la couche NTD.**

**A** À gauche, le premier modèle du récepteur NMDA GluN1/GluN2B entier de rat produit au laboratoire à partir des structures pontées parues en 2014. Afin d'améliorer la qualité de leurs cristaux, les cristallographes ont inséré un pont disulfure représenté ici par un ovale noir pour diminuer la mobilité de la couche NTD. À droite le deuxième modèle produit à partir de la structure de basse résolution, sans pont disulfure et dont les dimères de NTD sont plus écartés. **B** Comparaison entre les 20 modes normaux de plus basse fréquence calculés à partir de la conformation pontée (en abscisse) et à partir de la conformation non-pontée (en ordonnée) avec le champ de force 'calpha' (Hinsen and Kneller 1999, Grant et al. 2006). Les modes 2, 4, 6 et 7 sont identifiés par des flèches. Les mouvements des modes 2 et 6 sont retrouvés dans les modes 5 et 2 respectivement de la conformation qui possède les NTDs libres. **C** Comparaison entre les modes obtenus avec la conformation pontée et le vecteur différence entre les deux conformations par le calcul du cosinus entre les deux vecteurs. Les modes 2, 4, 6 et 7 présentent un cosinus élevé ce qui signifie qu'ils sont impliqués dans le passage d'une structure à l'autre.

### 2.1.4. Discussion

Dans cette partie, nous avons vu que nous avons la puissance de calcul nécessaire pour des calculs de modes normaux en tout atome dans un champ de force de mécanique moléculaire avec GROMACS. Cependant, nous ne sommes pas venus à bout des problèmes liés à la minimisation de notre modèle. En revanche, le calcul des modes normaux du récepteur NMDA entier a pu être réalisé sur les différents champs de force élastiques implémentés dans Bio3D. Les différentes vibrations harmoniques mettent en jeu des torsions entre les différentes couches et des mouvements de grande ampleur au niveau des dimères de NTDs.

Il n'y a pas à ce jour de donnée dans la littérature supportant l'idée que le mode de plus basse fréquence (numéro 1) qui correspond à un ploiment du récepteur entier ('bending', le récepteur entier se courbe et se penche vers la membrane) permette des interactions avec des protéines membranaires auxiliaires comme cela a été proposé (Krieger et al. 2015).

Au niveau de domaines individuels, la majorité des transitions obtenues étaient malheureusement de type rigide ('rigid body') : très peu de déplacements au sein même des domaines ont pu être observés en dehors de mouvements de faible amplitude d'ouverture/fermeture des 'clamshells' ou de twist (pour les NTDs uniquement). La très forte densité d'interactions et donc de ressorts au sein d'un domaine 'clamshell' fermé explique cette faible mobilité au sein des domaines. En effet, dans notre modèle les domaines ABD et le domaine NTD de GluN2B sont en position fermée à cause de l'occupation de leur site de liaison dans les structures de départ : glycine dans l'ABD de GluN1, glutamate et ifenprodil dans l'ABD et le NTD de GluN2B respectivement. Cette contrainte limite les informations que nous donnent les vibrations sur les conséquences de la fixation des agonistes et modulateurs allostériques. L'utilisation du champ de force de mécanique moléculaire de GROMACS dans lequel les liaisons ne sont pas figées aurait été intéressante de ce point de vue.

Par ailleurs, les deux structures utilisées possèdent une conformation de la machinerie d'activation (couches ABD et TMD) identique ce qui limite l'étude des mouvements au

sein de ces couches de domaines. Une réponse à ce problème est venue des nouvelles structures parues en 2016 dont certaines possèdent une conformation différente de la couche ABD (Tajima et al. 2016, Zhu et al. 2016). Ces nouvelles structures et l'utilisation d'un programme qui recalcule les modes de façon itérative ont permis d'enrichir notre étude et de résoudre le problème de l'utilisation d'un réseau élastique dans lequel les liaisons ne peuvent pas être rompues. De plus le code écrit pour les variables collectives de ce projet a pu être réinvesti par la suite lors de l'étude des transitions entre les différents états du récepteur (voir partie 2.3).



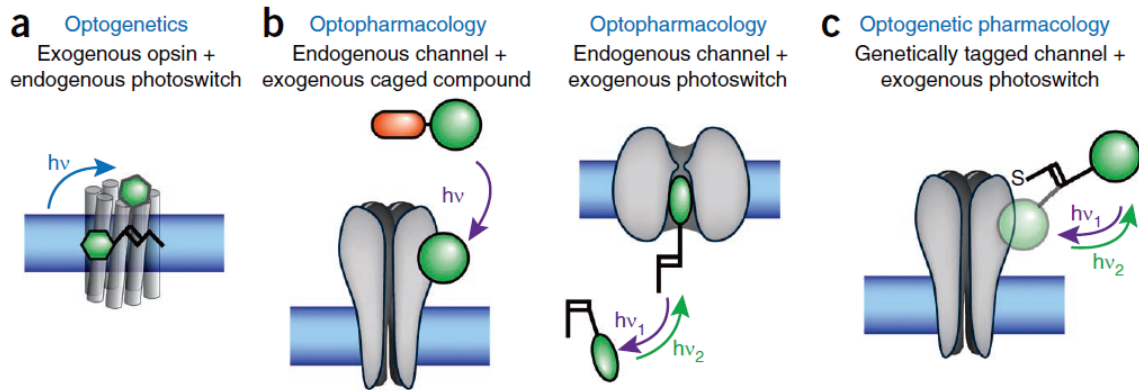
## 2.2. Ingénierie d'une famille de récepteurs NMDA photo-activables

### 2.2.1. Contexte

L'utilisation de techniques d'optique révolutionne les neurosciences. Les composés sensibles à la lumière permettent en effet de contrôler à distance de façon précise et avec une excellente résolution temporelle le comportement d'une protéine, d'un neurone ou d'un groupe de neurones (Deisseroth 2011, Miesenbock 2011). Les nouvelles techniques qui ont vu le jour et qui permettent de contrôler l'activité neuronale peuvent être classées de la façon suivante (Figure 2.2-1, Kramer et al. 2013) :

- l'optogénétique, qui correspond principalement à l'utilisation de la channelrhodopsin-2 et de l'halorhodopsin, des protéines photosensibles, comme activateurs. Le gène d'une de ces protéines est alors inséré dans le génome d'une lignée cellulaire qui l'exprime.
- l'optopharmacologie, qui correspond à l'utilisation de composés photosensibles comme des agonistes cagés ou photoconvertibles.
- la pharmacologie optogénétique qui est une combinaison des deux techniques précédentes : la modification génétique d'une protéine présente de façon endogène couplée à l'utilisation d'un composé photosensible permet de contrôler optiquement l'activité de la protéine modifiée.

Parmi ces différentes options, la pharmacologie optogénétique est la seule technique ayant une spécificité permettant d'étudier des sous-types particuliers de récepteurs.



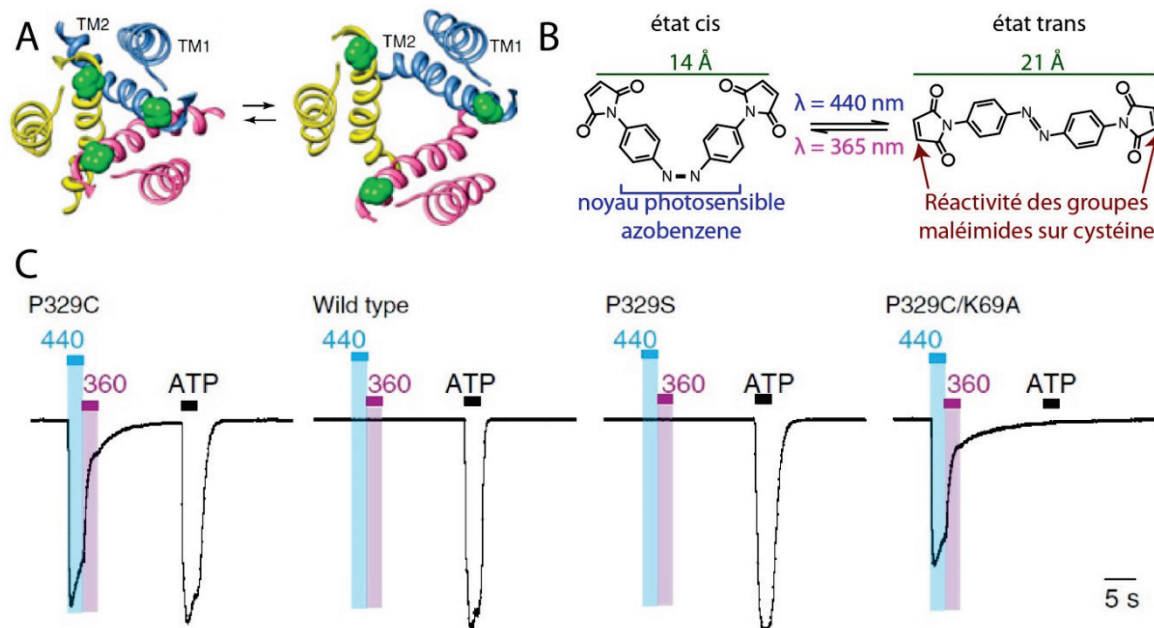
**Figure 2.2-1 : Classification des différentes techniques de contrôle des canaux ioniques par la lumière.**

**A** l'optogénétique permet un photo-contrôle de l'activité des cellules avec une spécificité pour une lignée cellulaire grâce à l'insertion du gène d'une protéine exogène photosensible dans cette lignée. **B** L'optopharmacologie n'a pas de spécificité cellulaire mais la précision d'une excitation en bi-photon permet de cibler efficacement des épines dendritiques uniques avec pour limitation le plan focal illuminé. **C** La pharmacologie optogénétique permet le ciblage d'une lignée cellulaire précise et va même jusqu'à une spécificité du sous-type de récepteur ciblé. Comme l'optopharmacologie, elle nécessite cependant l'ajout d'un composé photosensible (Kramer et al. 2013).

L'objectif du projet était de produire une famille de récepteurs NMDA directement activables par la lumière grâce à une stratégie de pharmacologie optogénétique. La technique envisagée a déjà été appliquée au récepteur canal trimérique P2X2 et il s'agissait de la transposer aux récepteurs NMDA (Lemoine et al. 2013, Browne et al. 2014).

L'idée est d'introduire dans le domaine de liaison des agonistes par mutagenèse dirigée deux résidus cystéines sur lesquels on fixe une molécule photosensible, le BMA (4,4'-bis(maleimido)azobenzène) qui alterne entre deux configurations *cis* et *trans* en fonction de la longueur d'onde d'illumination (Figure 2.2-2). Le BMA est rivié de façon covalente par chacune de ses deux extrémités aux deux cystéines introduites sur le récepteur et son isomérisation va modifier la distance entre les deux acides aminés d'attache, agissant ainsi sur l'état conformationnel et donc d'activation du domaine agoniste. Dans le cas du récepteur P2X, le BMA agit au niveau du pore dont il provoque directement l'ouverture. Dans notre cas en revanche, il agit au niveau du domaine ABD dont il provoque la fermeture, avec l'espoir que cette fermeture du domaine ABD conduise à

l'activation du récepteur, comme lorsqu'elle est permise par la liaison de l'agoniste. L'avantage du BMA réside dans la réversibilité de sa diastéréoisomérisation : il agit comme une agrafe moléculaire photo-isomérisable permettant un contrôle optique bidirectionnel de l'activation du récepteur.



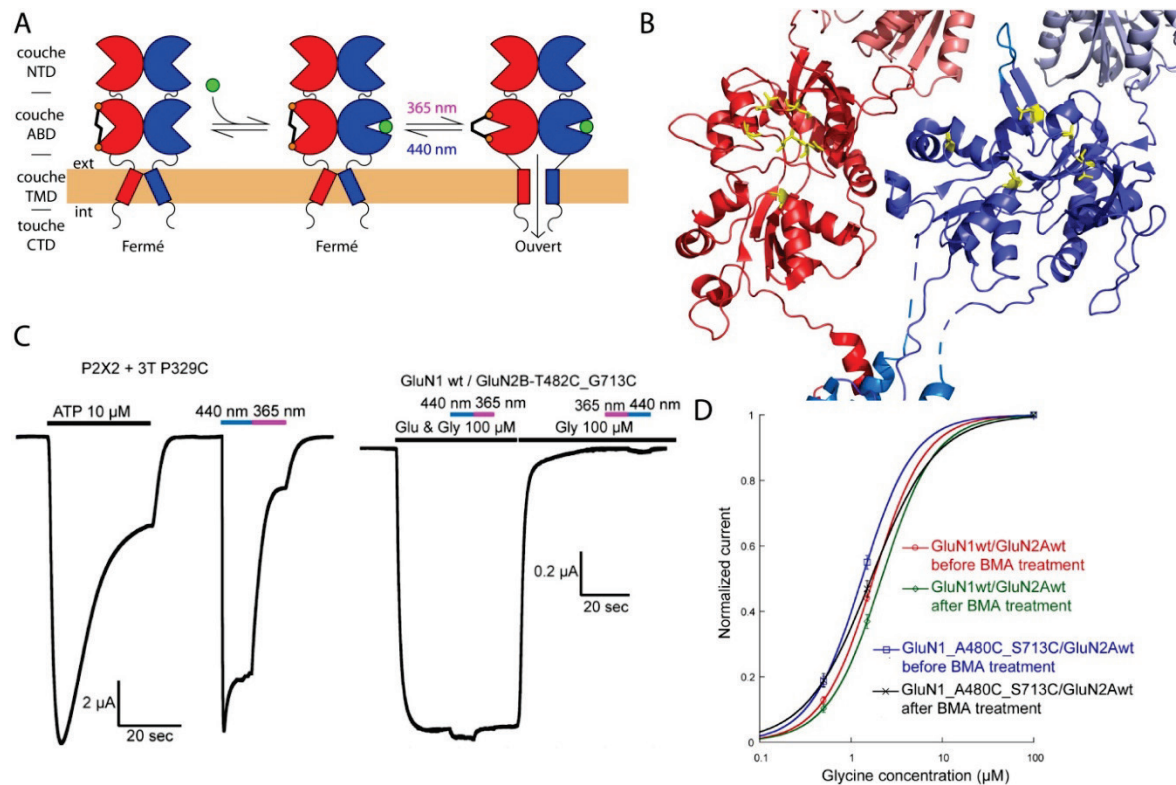
**Figure 2.2-2 : L'ouverture du canal trimérique P2X portant la mutation P329C par illumination à 440 nm après traitement au BMA.**

**A** Structure du canal P2X3 ouvert et fermé, seules les deux hélices transmembranaires centrales sont représentées. Le récepteur est trimérique. La position marquée en vert correspond à la proline 329 dont la mutation en cystéine permet l'ouverture du canal par action du BMA. **B** Le BMA en configuration *cis* et *trans*. L'illumination à 440 et 365 nm permet de passer d'une conformation à l'autre, modifiant la distance entre les deux extrémités de la molécule. **C** L'illumination à la longueur d'onde 440 nm du canal P2X3 portant la mutation P329C après traitement au BMA permet une activation comparable à celle déclenchée par son agoniste l'ATP (Browne et al. 2014).

## 2.2.2. Résultats

Nous nous sommes tout d'abord assurés que nous parvenions à reproduire les résultats obtenus sur P2X3 (Browne et al. 2014). L'expression du récepteur trimérique portant la

mutation P329C en ovocyte de Xénope nous a bien permis, après incubation dans du BMA, d'obtenir l'activation du récepteur par illumination de façon réversible (Figure 2.2-3).



**Figure 2.2-3 : Ingénierie d'un récepteur NMDA photoactivable.**

**A** Principe d'utilisation du BMA sur le récepteur NMDA, seul un dimère est représenté. Le récepteur NMDA nécessite la fermeture de l'ABD de GluN1 qui lie la glycine et de GluN2 qui lie le glutamate pour s'activer. On introduit les cystéines dans le domaine de liaison de l'agoniste de GluN1 ou de GluN2 avant traitement au BMA, permettant soit d'activer le récepteur par la lumière en présence de glutamate, soit en présence de glycine. **B** Différentes positions ciblées au niveau de l'ABD de GluN1 et GluN2. **C** À gauche, reproduction au laboratoire des résultats publiés avec P2X. À droite, test négatif d'activation par la lumière d'un mutant GluN2B du récepteur NMDA en présence de glycine. Une faible réponse à la longueur d'onde 440 nm est observée mais elle est présente également pour des récepteurs NMDA sauvages non traités au BMA. **D** Test de sensibilité à la glycine d'un récepteur NMDA contenant la sous-unité GluN1 mutée après traitement au BMA afin de savoir si la molécule est liée.

Une fois cette première étape passée, les mutations à tester ont été introduites dans l'ABD de GluN1 ou GluN2 dont plusieurs structures en forme fermée ou ouverte ont été publiées (Furukawa and Gouaux 2003, Furukawa et al. 2005, Jespersen et al. 2014). La fermeture de la crevasse de l'ABD est directement reliée à l'activation du récepteur (voir 1.3.7). On peut donc supposer qu'en fixant le BMA de part et d'autre de la crevasse, son isomérisation de la forme *trans* à la forme *cis* forcera la fermeture de l'ABD, mimant l'action de l'agoniste. On obtiendrait l'effet inverse pour le passage de *cis* à *trans*, qui aboutirait à un ABD ouvert et donc un récepteur inactif. Après identification des positions compatibles avec la taille du BMA, les mutants ont été produits et testés. Malheureusement, aucune position n'a permis d'activer ou de moduler l'activité du récepteur. Différentes pistes ont alors été explorées :

- L'utilisation d'autres composés photosensibles obtenus par une collaboration avec un laboratoire canadien et présentant des tailles différentes (Pozhidaeva et al. 2004) n'a pas permis d'obtenir des résultats positifs.
- Des courbes dose réponse de l'agoniste ont été réalisées dans l'espoir de détecter l'éventuelle liaison du BMA à l'ABD, avec l'idée qu'une molécule fixée sur l'ABD peut gêner la liaison de l'agoniste endogène (Figure 2.2-3).
- Des tentatives de fixation du BMA au niveau du TMD ont été effectuées afin de se rapprocher de la stratégie appliquée sur P2X.

La liste des positions testées est donnée en annexe.

### 2.2.3. Discussion

Malgré des résultats préliminaires encourageants, avec la reproduction des résultats publiés sur le récepteur P2X, nous ne sommes pas parvenus à conférer une photosensibilité au récepteur NMDA. Il est difficile de connaître la raison de cet échec et l'on se bornera donc ici à formuler des hypothèses. Il est possible que la fixation du BMA ne se produise que lorsque la distance entre les deux cystéines respecte très scrupuleusement la géométrie de la molécule, condition qui n'est peut-être pas respectée dans les positions que nous avons testées. De plus, le BMA étant une

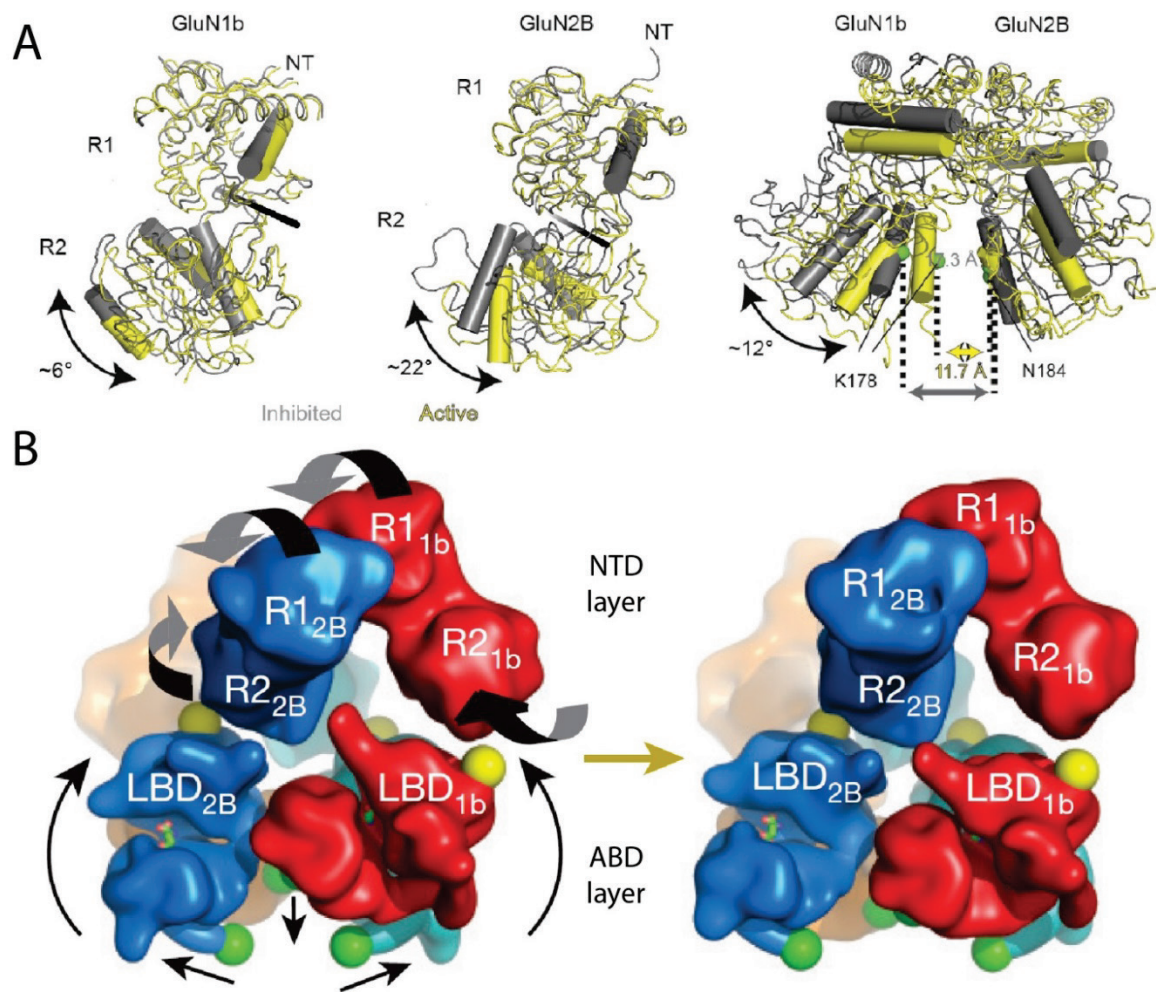
molécule relativement hydrophobe, sa fixation sur la protéine n'est peut-être effective que pour des positions proches de la membrane. Nous aurions pu dans ce cas avoir plus de chance avec les positions testées au niveau du TMD mais il faut noter que du fait des nombreux linkers, c'est une zone qui est beaucoup plus encombrée chez les récepteurs NMDA que chez les récepteurs P2X. Par ailleurs, l'hétérotétramérie obligatoire du récepteur NMDA rajoute également de la complexité, par exemple au niveau du pore où une force appliquée sur deux sous-unités seulement n'est peut-être pas suffisante pour déclencher l'ouverture avec l'agoniste complémentaire. Si l'approche avait été couronnée de succès, nous aurions pu envisager de cibler l'état conformationnel des NTDs avec le BMA afin d'obtenir une modulation allostérique photo-contrôlée.

D'autres techniques d'opto-contrôle ont été appliquées avec succès aux récepteurs-canaux du glutamate. Par une approche de pharmacologie optogénétique, un récepteur kainate GluK2 photosensible nommé LiGluR a ainsi été développé par l'utilisation d'un agoniste photo-isomérisable attaché à une cystéine introduite (Volgraf et al. 2006). L'illumination permet alors directement de placer l'agoniste à l'intérieur de l'ABD et de déclencher l'ouverture du canal. Cette approche pourrait également être envisagée au niveau des NTDs du récepteur NMDA avec un modulateur allostérique photo-isomérisable attaché de façon covalente. Plus récemment, une famille de récepteurs NMDA photosensibles a été conçue grâce à l'utilisation d'acides aminés non naturels. Dans ce cas l'illumination permet, à la façon d'un modulateur allostérique, d'augmenter ou de diminuer l'activité du récepteur sans interférer avec son patron d'activation naturel (Klippenstein et al. 2017).

## **2.3. An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity**

### **2.3.1. Contexte**

En 2016, une nouvelle série de structures complètes du récepteur NMDA obtenues par cryo-microscopie électronique est parue (Tajima et al. 2016, Zhu et al. 2016). Ces données concernent des conformations liées aux agonistes glutamate et glycine en l'absence de modulateur allostérique négatif (l'ifenprodil ou un équivalent, le Ro25-6981 étaient toujours présents dans les structures complètes antérieures), mais dont le pore est cependant fermé. Ceci s'explique par la faible probabilité d'ouverture du récepteur NMDA GluN1/GluN2B qui, même en présence de glutamate et de glycine en concentrations saturantes, n'est ouvert que 10 à 15 % du temps (Banke and Traynelis 2003, Erreger et al. 2005). Une de ces structures cependant, dont le TMD n'est pas résolu, est particulièrement intéressante car sa couche NTD est dans une conformation active (voir Figure 1.4-12 pour le modèle de fonctionnement des NTDs, Figure 1.4-13 la conformation active des NTDs sur un dimère isolé et Figure 2.3-1 pour la structure complète contenant les NTDs en conformation active) et l'arrangement de sa couche ABD est inédit avec une rotation des deux dimères d'ABD l'un par rapport à l'autre, un mouvement appelé rolling (Mony et al. 2011, Tajima et al. 2016). Par un raisonnement qui s'appuie sur le déplacement du branchement des linkers vers le TMD à la base de la couche ABD entre cette structure et les précédentes, les auteurs avancent que ce domaine extracellulaire représente un état actif du récepteur dont le pore non résolu serait ouvert. Il s'agit donc d'une conformation active putative.



**Figure 2.3-1 : Le domaine extracellulaire supposé actif du récepteur NMDA.**

**A** Comparaison de la structure des NTDs dans leur position active en jaune et inhibée en gris. Les domaines NTDs de GluN1 et GluN2B sont plus ouverts dans la conformation active. De plus l'arrangement dimérique est différent avec une rotation qui rapproche les deux lobes du bas (R2) des deux NTDs. Il a été montré que ces différentes caractéristiques des NTDs favorisent l'ouverture du récepteur NMDA (Gielen et al. 2009, Mony et al. 2011, Zhu et al. 2013). **B.** À gauche, le domaine extracellulaire d'une structure liée aux agonistes mais non active, à droite le domaine extracellulaire actif putatif. Les deux flèches de part et d'autre de la couche ABD illustrent le 'rolling', rotation des deux dimères d'ABD l'un par rapport à l'autre. Les flèches sous la couche ABD montrent les déplacements de la base des linkers ABD-TM3 que cette rotation provoque (Tajima et al. 2016).

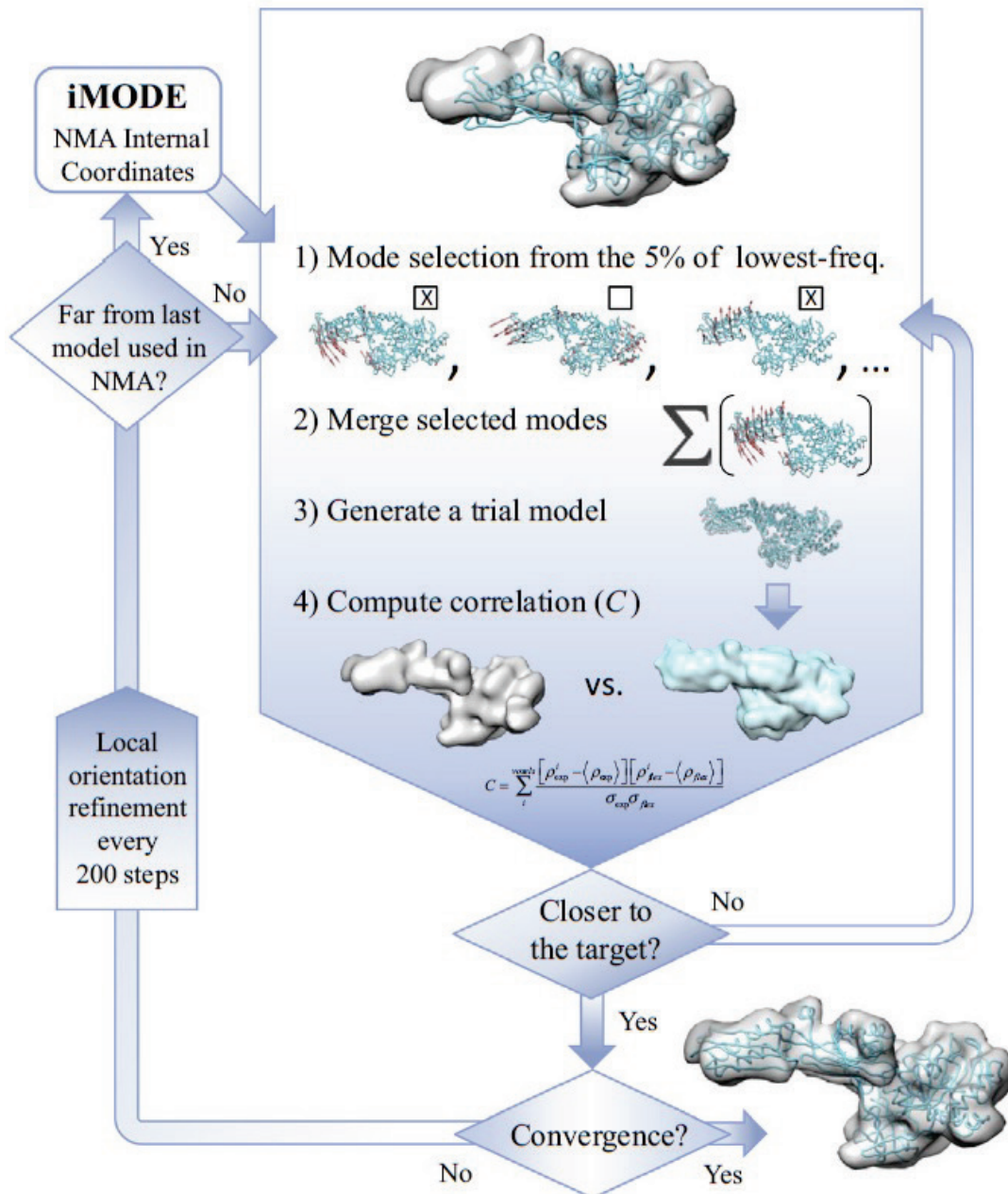
Les structures parues en 2014 avaient déjà révélé l'arrangement global du récepteur NMDA, en forme de montgolfière, avec un domaine extracellulaire particulièrement compact légèrement espacé du domaine transmembranaire et relié à ce dernier par les



linkers (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014). Elles illustraient la conformation du récepteur dans un état inhibé, révélant les différentes interfaces entre domaines et entre couches de domaines. Les interactions entre la couche NTD et la couche ABD étaient particulièrement intéressantes dans l'objectif de comprendre comment les modulateurs allostériques qui se lient au niveau NTD (Zinc, Ifenprodil et Spermine) favorisent ou défavorisent l'activation.

Cependant, l'absence d'une conformation différente de la couche ABD a limité nos analyses en modes normaux dans lesquelles cette partie du récepteur était très peu mobile car très compacte et très dense en interactions élastiques. La structure ci-dessus présente justement un arrangement différent probablement associé à l'activation du récepteur. Elle représente une opportunité pour tenter de comprendre comment les mouvements de la couche NTD sont liés à ceux de la couche ABD et *in fine* à l'ouverture du canal au niveau TMD. Dans le travail présenté dans cette partie, nous tentons de répondre à cette question par une approche mêlant expériences d'électrophysiologie et de biochimie et modélisation avec l'utilisation d'un nouvel outil : iMODFIT (Lopez-Blanco and Chacon 2013).

iMODFIT est un outil de fitting flexible ('flexible fitting') basé sur le calcul de modes normaux en coordonnées internes. Il permet d'adapter une structure protéique à une enveloppe de densité obtenue par exemple par cryo-microscopie électronique. L'utilisation de coordonnées internes que sont les angles dièdres de la chaîne principale à la place des coordonnées cartésiennes classiques a l'avantage de préserver implicitement la géométrie des liaisons en limitant les distorsions et de réduire de façon substantielle le nombre de variables, facilitant les calculs. Son fonctionnement est présenté dans un diagramme Figure 2.3-2.



**Figure 2.3-2 : Diagramme du fonctionnement d'iMODFIT.**

Lors d'une simulation, les modes de vibration de la structure de départ sont calculés en utilisant un champ de force élastique. Puis une sélection aléatoire parmi 5% de ces modes (ceux de plus basse fréquence) sert à générer un vecteur de déformation qui permet de proposer des structures d'essai. Si une structure d'essai permet de se rapprocher de la densité cible, elle est conservée. Les tirages et essais sont appliqués de manière itérative en recalculant cependant les modes normaux chaque fois que la structure acceptée dévie de plus de 0.1 Å de RMSD de celle utilisée précédemment pour le calcul des vibrations. La procédure est répétée jusqu'à la convergence. De plus, un alignement en corps rigide est réalisé toutes les 200 itérations pour s'assurer que la structure reste correctement placée dans la densité cible (Lopez-Blanco and Chacon 2013).

### **2.3.2. Article soumis**

# An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity

Jean-Baptiste Esmenjaud<sup>1#</sup>, David Stroebel<sup>1#</sup>, Kelvin Chan<sup>3</sup>, Teddy Grand<sup>1</sup>, Mélissa David<sup>1</sup>, Lonnie P. Wollmuth<sup>3</sup>, Antoine Taly<sup>2\*</sup> and Pierre Paoletti<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS)  
Ecole Normale Supérieure, Université PSL  
CNRS, INSERM  
F-75005 Paris, France

<sup>2</sup> Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC)  
Laboratoire de Biochimie Théorique  
Université Paris Diderot, Université PSL, CNRS  
F-75005 Paris, France

<sup>3</sup> Graduate Program in Neuroscience & Medical Scientist Training Program (MSTP)  
Departments of Neurobiology and Behavior & Biochemistry and Cell Biology  
Stony Brook University  
Stony Brook, NY 11794, USA

# co-first authors

\* co-corresponding authors: [pierre.paoletti@ens.fr](mailto:pierre.paoletti@ens.fr), [antoine.taly@ibpc.fr](mailto:antoine.taly@ibpc.fr)

Key words: ligand-gated ion channel, receptor, NMDA, allostery, gating, glutamate

Abbreviated title: An allosteric switch controls NMDAR activity

## **Abstract**

NMDA receptors (NMDARs) are glutamate-gated ion channels that are key mediators of excitatory neurotransmission and synaptic plasticity throughout the brain. They form massive heterotetrameric complexes endowed with unique allosteric capacity provided by eight extracellular clamshell-like domains arranged as two superimposed layers. Despite an increasing number of full-length NMDAR structures, how these domains cooperate in an intact receptor remains poorly understood. Here, combining experimental and *in silico* analysis, we identify a rolling motion at a yet unexplored interface between the two constitute dimers in the agonist-binding domain (ABD) layer as a key structural determinant in NMDAR activation pathway. This rotation acts as an allosteric switch that tunes channel opening depending on the conformation of the membrane-distal N-terminal domain (NTD) layer. Our work unveils how NMDAR domains move in a concerted manner to transduce conformational changes between layers and command receptor activity.

## Introduction

A leading concept in molecular biology is the notion of ‘allosteric interaction’ or ‘communication over distance’ by which topographically distinct sites in a macromolecular structure interact through a discrete and reversible conformational change referred to as the ‘allosteric transition’<sup>1</sup>. Allostery is widespread in the protein world and fulfills essential function in cellular signaling and inter-cellular communication<sup>2,3</sup>. Such is the case of ligand-gated ion channels (LGICs), which mediate fast neurotransmission in the brain<sup>4,5</sup>. LGICs undergo a key allosteric transition that converts chemical energy (neurotransmitter binding) into mechanical work (opening of a transmembrane ion channel pore). LGICs also undergo intense regulation through allosteric modulatory sites, distinct from the agonist and pore sites, which allow tuning of receptor channel activity by small ligand molecules known as allosteric modulators<sup>2,4</sup>. Because of their high druggability and molecular selectivity, allosteric modulatory sites are of prime importance in pharmacology and therapeutics (e.g. refs. 3,6,7). Oligomerisation and long-range conformational changes provide an adequate setting for allostery, as emphasized by the classical examples of pentameric receptor channels<sup>8</sup>. NMDA receptors (NMDARs), members of the superfamily of ionotropic glutamate receptors (iGluRs) which mediate excitatory neurotransmission and synaptic plasticity, are no exception as they assemble and operate as tetramers and contain a rich variety of modulatory sites scattered throughout the receptor<sup>9,10</sup>. However, the vast majority of our current understanding of iGluR mechanisms has focused and been conceptualized around individual domains or dimers of domains<sup>9,11-13</sup>. To grasp properly how these important receptors work and are regulated, it is now essential to integrate more intact views of the receptor and reason within the context of the tetrameric complex. The boom in structural studies of iGluRs, including the recent decoding of full-length X-ray and cryo-EM structures of NMDARs<sup>14-18</sup>, provide an exceptional structural framework to tackle this issue.

iGluRs form massive (>400 kDa) molecular complexes that operate as homo- or hetero-tetramers. Individual iGluR subunits display a modular architecture, consisting of four domains<sup>9,13</sup>: two large bilobate (clamshell-like) extracellular domains, the N-terminal domain (NTD) and the agonist-binding domain (ABD); a transmembrane domain (TMD) where the ion channel resides, and an intracellular carboxy-terminal domain (CTD) involved in receptor trafficking and signaling. In a functional receptor, the four subunits adopt a dimer-of-dimers arrangement and give rise to a stratified protein with at the ‘top’ the NTDs, at the bottom the TMD and CTD, and sandwiched in between the ABDs (**Fig. 1a**). The region encompassing the ABD layer and the TMD forms the core gating machinery. Because two adjacent ABDs pair through their top lobes, clamshell closure induced upon glutamate (or glycine) binding translates into separation between the ABD bottom lobes, which in turn pulls upon the TMD, eventually leading to channel gate opening<sup>11,19</sup>. Although all iGluRs share this general activation mechanism, full-length structures of NMDARs reveal strikingly different arrangements of the extracellular region compared to AMPA and kainate receptors. In the latter, the NTDs ‘float’ above the ABDs making minimal interactions with the gating core

region<sup>20-23</sup>. In contrast, in NMDARs, the NTDs literally sit on top of the ABDs resulting in extensive interdigitations between the NTD and ABD layers<sup>14-18</sup>. This tight NTD-ABD coupling likely relates to the unique role of NMDAR NTDs in allosteric signaling. In NMDARs, NTDs allosterically control key gating properties (channel open probability, deactivation kinetics)<sup>24,25</sup> and harbor several binding sites for small molecule allosteric modulators, providing powerful ways to regulate receptor function<sup>10,26</sup>. Similar to the ABDs, NTDs operate as dimers and adopt various conformational states<sup>27</sup>. Allosteric modulators act by shifting the conformational equilibrium between 'active' and 'inactive' states of the NTD dimers, thus boosting or dampening receptor activity<sup>17,24,28-30</sup>.

While there is strong evidence that local conformational rearrangements within individual domains or dimers of domains are involved in NMDAR gating and modulation<sup>11,31-33</sup>, the importance, dynamics and functional impact of contacts *between* the two constitutive dimers remains ill-defined. Similarly, the long-distance allosteric coupling between the membrane-distal NTD layer and the downstream gating machinery, >100 Å apart, is poorly understood. In this work, using a combination of macroscopic and single-molecule electrophysiology, biochemical cross-linking and computational approaches, we explore the dynamics of the complete NMDAR tetramer. We focused our analysis on the inter-layer and inter-dimer contacts revealed by the full-length GluN1/GluN2B structures, aiming to understand the long-range conformational interplay in the allosteric unit formed by the extracellular domains. We identify a rotation motion (or rolling) at the interface between the two ABD dimers as a critical quaternary reorganization during NMDAR gating. We show that trans-layer communication converges through this rolling motion, which thus emerges as a key allosteric transition in the tetrameric complex. These results allow us to propose a first integrated view of NMDAR molecular operation, with important consequences on receptor physiology and drug action.

## Results

### NMDAR activation requires inter-domain mobility

Recent crystal and cryo-EM structures of full-length NMDARs demonstrate broad interactions between the receptor's extracellular domains, with contacts both within and between subunits. Particularly striking is the extensive interface between the NTD and ABD layers<sup>14-18</sup>, providing molecular routes for the tight allosteric coupling between the NTDs and the downstream gating machinery<sup>24,26</sup>. To assess the importance of inter-domain contacts in NMDARs, we turned to a cross-linking strategy based on engineered disulfide bridges and aiming at restraining the conformational mobility of the targeted interface. Guided by the full-length structure of the inhibited GluN1/GluN2B receptor (in complex with glutamate, glycine and a GluN2B antagonist; TMD pore closed)<sup>14,15</sup>, we introduced pairs of cysteines at positions close enough in space to disulfide bond (Ca-Ca distance <7 Å)<sup>34</sup>. We targeted five sites, either in the NTD or ABD layer (sites 4 and 5, respectively; **Fig. 1a**) or at the interface between the two (sites 1, 2 and 3; **Fig. 1a**). We then expressed each GluN1/GluN2B double cysteine mutant receptor and, using electrophysiology, measured its activity and redox sensitivity (**Fig. 1b**). Treatment with the reducing agent dithioerythritol (DTE) increased current amplitude of all mutant receptors. Levels of potentiation were particularly massive (>100-fold) at sites 1 (GluN1-N492C/GluN2B-S188C) and 2 (GluN1-H162C-D765C/GluN2B WT), contact zones between GluN1 ABD and the NTD layer. At both sites, a striking 'awakening' phenotype was observed, which transformed almost completely silent receptors (currents barely measurable) prior DTE treatment to fully-active receptors (currents similar in amplitude to that of WT receptors) following disulfide bond breakage (**Fig. 1b-c & Table 1**). Similar effects were observed on mutant receptors lacking the endogenous (and redox sensitive) GluN1 disulfide bridge (GluN1-C744A-C798A)<sup>35</sup>, thus demonstrating the critical role of the introduced disulfide bond (**supplementary Fig. 1a & Table 1**). Marked potentiations (~10-fold) were also observed at site 3, another contact region between the NTD and ABD layers, and at site 5, an ABD layer site where the two constitutive GluN1/GluN2 ABD dimers come in close proximity. In contrast, more modest effects were seen at site 4 (two different pairs of cysteines tested), a NTD layer site connecting the two constitutive GluN1 and GluN2 NTD dimers (**Fig. 1b-c & Table 1**).

Single mutant controls confirmed that both engineered cysteines are necessary to confer the enhanced redox sensitivity (**supplementary Fig. 1b & Table 1**), while reversibility experiments using the oxidizing agent DTNB provided further support for the involvement of disulfide bonds (**supplementary Fig. 1c & Table 1**). In the case of inter-subunit interfaces (sites 1 and 5), we obtained direct evidence for the formation of disulfide links between GluN1 and GluN2B subunits by performing non-reducing western blots, and their respective controls using single cysteine mutants or reducing conditions (**Fig. 1.d**). The dramatic 'unlocking' phenotypes observed at interfaces 1 and 2, along with the results obtained at



positions 3 and 5, demonstrate that GluN1/GluN2B NMDARs can be trapped functionally in an inactive state, as represented by the currently available crystal structures. These results also reveal that conformational freedom at critical domain interfaces between the NTD and ABD layers, both within (sites 2 and 3) or between (site 1) subunits, is necessary for proper receptor activity. Screening of disulfide bridges in GluN1-GluN2A receptors at homologous interfaces also revealed marked potentiation upon DTE release of the conformational constraint (**supplementary Fig. 1d**), indicating shared mechanisms between GluN2A and GluN2B receptors.

### **Trapping a rolling motion at the ABD inter-dimer interface results in super-active receptors**

We next sought to trap NMDARs in a high activity state. Although no structure of an active full-length NMDAR is available, a complete cryoEM structure of the GluN1/GluN2B extracellular region (NTDs + ABDs) was recently described, likely capturing an active state as evidenced by the 'compact' NTD dimer conformation (apposition of GluN1 NTD and GluN2B NTD lower lobes)<sup>17</sup>. In this TMD-lacking structure, the two ABD dimers undergo a conspicuous rotation relative to each other of  $\sim 13^\circ$ . We coined this inter-ABD dimer rotation 'rolling'. We decided to investigate the functional effect of this motion by introducing cysteines to disulfide trap the inter-ABD dimer interface and thus prevent rolling. In the inactive conformation, the two ABD dimers contact each other through a GluN1-GluN2 intersubunit interface involving the short GluN1  $\alpha$ -helix E and GluN2B  $\alpha$ -helix K. As shown in Figure 1, mutating GluN1-R673 and GluN2B-L795 to cysteines at this interface (site 5) locks the receptor in an inhibited state (**Fig. 1**, interface 5). In the rolled conformation, these two residues move apart by several Angstroms, and a new interface is formed between GluN1  $\alpha$ -helix G and GluN2B  $\alpha$ -helix K. A new duo of facing residues emerges, with GluN2B-L795 switching partner from GluN1-R673 to GluN1-E698 (C $\alpha$ -C $\alpha$  distance of 7.7 Å; **Fig. 2a**). Inspired by this partner swap, we co-expressed GluN2B-L795C with GluN1-E698C. Resulting receptors carried currents of particularly large amplitudes, while western blots confirmed the spontaneous formation of a redox sensitive disulfide bond between the mutant GluN1 and GluN2B subunits (**Fig. 1d**). Trace of GluN1-E698C homodimers was also observed (see also ref. 36), prompting us to use the additional GluN1-E698S control mutant in our functional tests. Using MK-801 inhibition kinetics to assess the receptor channel activity (see Methods), we discovered that trapped 'rolled' GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors displayed a massive increase in channel open probability (channel  $P_o$ ), as evidenced by the 5.4 fold  $\pm$  1.2 (n=24) acceleration in MK-801 inhibition on-rate compared to wild-type or single-mutant control receptors (**Fig. 2b-c**). The MK-801 kinetics were in fact so fast that off-rate MK-801 washing kinetics, usually extremely slow, could also be easily quantified, revealing a pronounced 7.9  $\pm$  2.1 (n=23) fold speeding of recovery kinetics (**Fig. 2c**). Similar effects were also observed at GluN1/GluN2A receptors (**supplementary Fig. 2a-b**), although with lower amplitudes as expected from the higher basal maximal channel  $P_o$  of

GluN2A vs GluN2B receptors (0.5 vs 0.1)<sup>24,37</sup>. Whole-cell patch-clamp experiments performed on HEK cells fully confirmed the effects observed in *Xenopus* oocytes (**supplementary Fig. 2c-d**). These results show that ABD dimer rolling motion profoundly impacts NMDAR activity. Receptors trapped in a rolled conformation are functionally switched to a super-active state, in which agonist-induced channel gate openings are greatly facilitated.

### **Super-active receptors are resistant to allosteric modulation**

Encouraged by the strong impact of 'rolling' on the receptor gating, we subsequently investigated the influence of 'rolling' on receptor pharmacology. For that purpose, we determined the sensitivity of receptors trapped in the rolled-state (GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors; see above) to the agonists glutamate and glycine, and to various allosteric modulators. Exploiting the rich pharmacology conferred by the GluN2B NTD<sup>10</sup> (**Fig. 3a**), we tested the sensitivity to ifenprodil, the prototypical GluN2B-selective antagonist, and to spermine, zinc and protons, all found endogenously in the brain and fine-tuning NMDAR signaling<sup>9,10,38</sup>. We found that whatever the modulatory ligand, the 'rolled' receptors displayed a striking phenotype of resistance to allosteric modulation. As assessed by measurements of IC<sub>50</sub>s from full dose-response curves, inhibition by protons was reduced by >10-fold, while inhibition by zinc and ifenprodil were reduced by >80-fold and >100-fold, respectively (**Fig. 2b**; and see **supplementary Fig. 3a** for single mutant controls). For zinc and ifenprodil, the rightward shift in sensitivity was as large as that obtained when removing the whole GluN2B NTD where both ligand bind (dashed curves, **Fig. 3b**). The GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors are therefore largely insensitive to negative allosteric inhibition. Moreover, a spermine sensitivity test showed complete loss of spermine potentiation of 'rolled' GluN2B receptors. Again, the situation was comparable to that observed on NTD-deleted receptors (**Fig. 2c**, and see **supplementary Fig. 3b** for single mutant controls). Thus, rolled GluN2B receptors are also 'immune' to allosteric potentiation. Recording from mutant GluN1/GluN2A receptors revealed that the resistance of 'rolled' GluN2B receptors to allosteric modulation could be extended to GluN2A receptors (**supplementary Fig. 3d**). In particular, the NTD-mediated high-affinity (nM) zinc sensitivity of GluN2A receptors was almost fully suppressed, with a rightward displacement of IC<sub>50</sub> by 2 orders of magnitude. Hence, preventing the rolling-unrolling ABD motion has a major influence on the receptor's allosteric capacity, by functionally uncoupling the NTDs from the downstream gating machinery.

Finally, we investigated the sensitivity of rolled GluN2B receptors to glutamate and glycine. While glutamate sensitivity was only slightly reduced (2-fold increase in EC<sub>50</sub>), the effect on glycine sensitivity was stronger (4-fold increase in EC<sub>50</sub>) (**Fig. 3d** and see **supplementary Fig. 3c,e** for control mutants and GluN2A receptors), potentially due to conformational constraints imposed by the disulfide bridge grafted onto the glycine-binding GluN1 ABD (see Discussion).

## Rolling is coupled to NTD motions and favors pore opening

Our disulfide bridge results demonstrate that NMDARs are amenable to state trapping and that a simple conformational switch at the ABD tetrameric interface governs interconversion between active and inactive states of the receptor. They do not provide information on the conformational pathway between those states, however. Moreover, active NMDARs are still structurally ill-defined since in the only 'active' structure available, obtained using cryo-EM<sup>17</sup>, the TMD region is missing preventing direct observation of receptor activation (i.e. pore opening). 3D modelling techniques have proven useful to study conformation transitions between various states of ion channels and receptors, including iGluRs<sup>39-45</sup>. Accordingly, we first produced a full length model of GluN1-GluN2B NMDAR (lacking the C-terminus) combining the information of the inhibited state crystal structures (in complex with agonists and a GluN2B allosteric inhibitor)<sup>14,15</sup> and reconstructing the missing loops (see Methods). We then modelled the transitions between the different structures of the receptor using iMODFIT (ref. 46 and see Methods), a program allowing flexible fitting of atomic structures into EM maps based on Normal Mode Analysis, and that has proven useful to study concerted motions of biomolecular structures (e.g. refs. 47-49). When fitting our reconstructed inhibited state full-length model into the TMD-missing 'active' state EM map, several features caught our attention (**Fig. 4, Supplementary Movies**). First, the RMSD between our model and the target structure (agonist-bound 'active' state, 5FXG)<sup>17</sup> dropped from 5.3 to 2.4 Å (2267 aligned C $\alpha$ ), indicating a satisfactory fit (**Fig. 4a**). Second, when comparing the fitting intermediates with the structure of the GluN2B NMDAR captured in a non-active state (agonist bound, no antagonist; pdb 5FXI)<sup>17</sup>, we noticed a minimum at 2.7 Å (**Fig. 4a**), revealing that the trajectory passes by this experimentally determined structural state, even though this later is not used as input (**Supplementary Fig. 4a**). This structural match supports the realistic nature of our modelling. Third, the fitting trajectory could be decomposed into three distinct and subsequent steps (**Fig. 4b-d**). Step 1, resulting in a 5FXI-like structure, involves mostly the membrane-distal NTD layer with the two NTD dimers behaving as rigid bodies and moving apart from each other (**Fig. 4b**). In the following step (Step 2), the two constitutive NTD dimers adopt a more compact conformation (with the GluN1 and GluN2 NTDs getting closer), while rolling of the two constitutive ABD dimers occurs. These structural rearrangements appear highly concerted (**Fig. 4c**). Eventually, in the last part of the run (Step 3), major changes occur in the linking segments joining the pore TM3 helices to the ABDs with GluN1 linkers pushing down in a vertical movement and GluN2B linkers pulling towards the sides away from the channel four-fold axis of symmetry. Those motions are accompanied by a conspicuous dilatation of the pore, as manifested by the splaying apart of the upper end of the TM3 helices (**Fig. 4d**, right panel). Measurements of the pore radius revealed a wide enlargement of the ion conduction pathway around the gate region (**Supplementary Fig. 4b**), reminiscent of the iris-type pore opening observed at AMPARs<sup>23</sup>. Although the fitting is realized on the extracellular domain (ECD) density only

(sole density available), the elastic network model used for NMA maintains a realistic TMD and provides insight in the missing part of the structure (i.e. the transmembrane channel). Overall, our iMODFIT analysis illuminates the fundamental role of ABD rolling in signal propagation in intact NMDARs. On one hand, it controls the energetics of the channel gate by acting on the TMD linkers as a gating switch; on the other, it transmits structural rearrangements of the 'upper' NTD layer to the downstream gating machinery, thus permitting inter-layer allosteric coupling.

### **Structural rearrangements of an inter-layer loop during rolling**

NMDARs stand out from AMPA and kainate receptors by the extensive contacts between the NTD and ABD layers. In particular, in the inhibited state GluN1/GluN2B structure<sup>14,15</sup>, a GluN1-specific loop (known as loop 2) which protrudes from GluN1 ABD upper lobe wedges in between GluN1 and GluN2B NTD lower lobes, making direct interaction with GluN2B NTD  $\alpha 4$  helix. When covalently attaching this contact, receptors are fully silenced, in agreement with their immobilization in an inhibited state (**Fig. 1b**, site 1 GluN1-N492C/GluN2B-S188C). Our modeling results reveal that loop 2 undergoes important structural rearrangements upon rolling, by sliding 'downwards' GluN2B  $\alpha 4$  helix. Accordingly, residues mutated to capture the inhibited state are moving away while GluN1-K495 and GluN2B-N192 are coming close (**Fig. 5a-b & Supplementary Movies**). The functional significance of the sliding motion was tested experimentally via the mutation of those two residues into cysteines aiming to trap an active state at this inter-layer interface. Assessment of channel activity using MK-801 revealed a marked (2-fold) acceleration of MK-801 inhibition kinetics, indicative of an increased channel  $P_o$  (**Fig. 5c**). Western blots confirmed the formation of a disulfide bridge (**Fig. 1d**), thus further buttressing the dynamic nature of NTD-ABD interactions during gating of intact NMDARs.

### **Rolling controls channel flipping to open states**

To gain further insights into the functional significance of the rolling mechanism and assess how it impacts NMDAR activation, we turned to single-channel recordings. Recordings of individual receptor molecules provide a powerful tool to capture prominent features of NMDAR gating energetics and kinetics<sup>19,37,50</sup>. We recorded single NMDAR channels either wild-type receptors (GluN1/GluN2A or GluN1/GluN2B) or disulfide-locked super-active receptors (GluN1-E698C/GluN2A-L794C or GluN1-E698C/GluN2B-L795C). For GluN2A and GluN2B, the super-active construct significantly enhanced receptor gating (**Fig. 6a & Supplementary Fig. 5a-b**), in agreement with the results obtained at the macroscopic level. For GluN1/GluN2B receptors, equilibrium channel open probability ( $P_o$ ) increased nearly 2.5-fold, matching very well the 2.81-fold change in MK-801 inhibition kinetics measured on whole oocytes in similar conditions (pH 8.0; **Supplementary Fig. 5c-d**). The increase in single-channel  $P_o$  reflected a significant increase in mean open time as well as a significant

decrease in mean closed time (**Fig. 6b & Supplementary Table 4**). Super-active GluN2B receptors spent most of the time in an active open channel state (mean equilibrium  $P_o \pm$  SEM of  $0.74 \pm 0.07$  [ $n=5$ ]), with individual  $P_o$  reaching values close to unity (0.94). In contrast, wild-type GluN2B spent most of the time inactive (mean equilibrium  $P_o$  of  $0.29 \pm 0.05$  [ $n=5$ ]; highest individual  $P_o$  value of 0.39). Given the pH insensitivity of super-active receptors (but not of wild-type receptors; **see Fig. 3b**), this boost in  $P_o$  is expected to be magnified even further at physiological pH (**Fig. 6b, dashed lines**).

Following agonist binding, NMDARs undergo a series of kinetically resolvable transitions before pore opening. At-least three non-conducting and two conducting states are apparent from fully-liganded receptors<sup>37,51,52</sup>. To further define how ABD rolling influences NMDAR function along the activation pathway, we fit our single-channel dwell-time histograms to a previously validated kinetic model of NMDAR activation<sup>52</sup>. Compared with wild-type receptors, super-active receptors showed marked reduction of short openings and complete disappearance of long closures (**Fig. 6c & Supplementary Fig. 6**). This translated into clear changes in the energy profile on the pathway to receptor activation, resulting in enhanced fractional occupancies of open states (**Fig. 6d & Supplementary table 5**). Remarkably, these effects were best accounted by an 8-fold shift of a single equilibrium constant ( $K_{eq}$ ), that of the opening isomerization from C1 to O1 ( $C_1-O_1$ ). These results identify the inter-dimer ABD rolling motion as a key structural event closely associated with the flipping of closed NMDAR channels into a conductive and functionally-active open state.

## Discussion

The fundamental role of domain dimerization in iGluR activation, assembly and regulation is firmly established<sup>9,11-13,53</sup>. Although dimer models of iGluRs have proved immensely useful to forge our understanding of how these receptors work, they provide simplified views and lack critical information about how the two pairs of dimers dynamically interact in the full-length tetrameric assembly. Another key unanswered question concerns communication between layers within an intact receptor, an issue most relevant for NMDARs that display strong allosteric coupling between the membrane-distal NTDs and the downstream ABD-TMD gating core<sup>17,27-29</sup>. Thus, there are gaps in knowledge both in the receptor's lateral dimension, between the two constitutive dimers, and vertically, between layers. In this work, we help fill these gaps. Using a combination of biochemical, functional and structural modelling analysis, we identify a rolling motion between the two constitutive ABD dimers as a key structural mechanism in NMDAR activation and allosteric modulation. Our single-channel kinetics analysis shows that this reorientation of the two ABD dimers precipitates pre-open closed channels to switch into the active open state. Moreover, we establish that inter-dimer ABD rolling provides a conformational route by which structural changes within the NTD layer<sup>17,24,27-29,43</sup> are transduced into rearrangement of the downstream gating machinery. Altogether, our results broaden our views of NMDAR operation from a dimeric to a more realistic tetrameric framework, and provide integrated views of long-distance domain coupling and dynamics in an intact NMDAR. Our work also highlights the potential of the iGluR inter-dimer interfaces as novel sites for pharmacological manipulations.

As evidenced by the complete silencing of receptor activity, our disulfide trapping experiments reveal that conformational mobility at the NTD-ABD layer interface is a prerequisite for receptor gating. This silencing phenotype differs strikingly from previous results showing that conformational freezing of individual domains within a given layer alters but not prevent receptor activation<sup>17,28,29,32,54</sup>. This essential inter-layer mobility involves both inter- and intra-subunit conformational rearrangements. Bridging the ABD to the NTD within the same GluN1 subunit (site 2, **Fig. 1**) produced particularly large effects, highlighting the critical importance of structural rearrangements of the obligatory GluN1 subunit during receptor activation. This result corroborates previous findings that the GluN1 NTD, together with the GluN2 NTD, undergoes large-scale conformational dynamics during receptor gating involving interlobe opening-closure and twist-untwisting motions<sup>16,17,29,43</sup>. Although NMDARs devoid of NTDs are able to gate<sup>28,55-57</sup>, in intact receptors, NTDs are not static and activation of the receptor requires concerted conformational rearrangements between the NTDs and ABDs (see **Supplementary Movies**). The tight packing of the NMDAR extracellular region<sup>14,15</sup> compared to the more loosely organization in AMPA and kainate receptors, likely imposes strong structural constraints and inter-dependence on NMDAR extracellular modules. Interestingly, the NMDAR NTD-ABD interface is an important locus for allosteric modulation, harboring potential binding sites for small-molecule drug compounds<sup>58</sup>, as well

as hosting GluN1 subunit exon-5 splice motif<sup>59</sup>. Alterations in the stability of the NTD-ABD interactions emerge as an effective mechanism to influence receptor activity.

Recent cryo-EM data obtained on the GluN1/GluN2B receptor suggest that the two ABD dimers undergo a significant rotation movement when the receptor transit from the non-active to the active conformation<sup>17</sup>. We now provide direct functional evidence that this rolling motion between the two pairs of ABD heterodimers is an essential step in the receptor gating mechanism. Inter-dimer ABD rolling acts as a gating switch that controls the energetics of channel opening but also as a pivotal allosteric transition, that structurally and functionally couples the 'upper' NTD region with the receptor's gating core. Reorientation of the two GluN1/GluN2 ABD dimers in the tetrameric receptor provides a simple and powerful physical mechanism for translating structural changes of the NTD region to alterations of the ion channel gate (**Fig. 6e; Supplementary Movies**). In this scheme, close apposition of the NTD lower lobes, as observed in the 'active' structure of the isolated GluN1/GluN2B NTD dimer<sup>17</sup>, favors ABD rolling which in turn increases channel activity. This is presumably the conformation stabilized by the positive allosteric modulator spermine, which would act as a molecular 'glue' between GluN1 and GluN2B NTD lower lobes<sup>28</sup>. Accordingly, super-active mutant receptors, locked in a rolled state, display an exceptionally high channel  $P_o$ , and are insensitive to spermine because there are already maximally activated (channel  $P_o > 0.7$ ). On the other hand, moving apart of the NTD lower lobes, as occurring when the NTD dimer transits to an 'inactive' state<sup>17</sup>, promotes an unrolled state of the two ABD dimers, which in turn decreases channel activity. Our data indicate that negative allosteric modulators such as zinc, ifenprodil or protons inhibit receptor activity by stabilizing this state. Super-active mutants are thus unresponsive to allosteric inhibition because the two ABD pairs covalently linked cannot escape from their trapped rolled state.

Our 3D modelling analysis based on an original NMA fitting approach allows us to reconstruct the unresolved TMD of the cryo-EM density<sup>17</sup>, and to explain how the ABD rolling motion may in turn influence the channel gate activity. It also provides the first insights onto NMDAR channel opening (**Supplementary Movies**). Trajectory analysis indicates that ABD rolling directly translates into structural changes of the short linkers connecting the ABD to the ion channel. These linkers, which exert mechanical force to pull open the channel<sup>52</sup>, are differentially affected by ABD rolling whether the GluN1 or GluN2 subunit is considered. In GluN1, ABD rolling is coupled to a vertical movement that exerts compression forces on the downstream linkers. In contrast, in GluN2B, ABD rolling translates into a lateral separation of the linkers away from the ion channel central axis. This motion likely leads to an outward displacement of the upper end of the TM3 helices, eventually favoring pore dilation and opening. It is important to stress that ABD rolling by itself is insufficient to trigger pore opening. Indeed, super-active mutant receptors locked in a rolled state are not constitutively active and still require agonists to gate. Agonist-induced closure of individual ABD clamshells and expansion of the ABD gating ring are the essential structural rearrangements necessary for channel gating<sup>23,31</sup>. ABD rolling provides a control mechanism that tunes the efficacy of

chemical energy (agonist-binding) conversion into mechanical forces (channel opening). Our single-channel analysis reveals that ABD rolling massively and specifically affects a distinct intermediate state along the activation pathway: the late transition between a pre-open closed state and an open state. Rolled receptors gate with high 'efficacy' because they have a lower energy barrier to activation and their active open state is more stable. In studies examining how the NTD-binding allosteric inhibitors zinc and ifenprodil affect the gating reaction of NMDARs, the same pre-open to open transition is preferentially affected<sup>60,61</sup>. Single molecule FRET analysis also indicates that zinc inhibition of NMDARs occurs by uncoupling of the agonist-induced changes at the ABD domains from the gating motions<sup>62</sup>. Our work provides the novel information that this uncoupling occurs through a quaternary rearrangement involving the unrolling of the two constitutive ABD dimers. We note that because of domain swapping<sup>20</sup> and tight packing between the NTD and ABD layers<sup>14,15</sup>, NMDAR NTDs are ideally positioned to affect how the two ABD pairs interact. Inter-dimer ABD rotations also occur in AMPARs<sup>63-65</sup>, although the impact on receptor activation differs<sup>64,65</sup>. This is not unexpected given the much weaker NTD-ABD interactions in AMPARs and the gating specificities of each receptor subfamily.

Because of their high gating efficacy, we expected super-active rolled NMDARs to display enhanced agonist sensitivity. This was not the case (see **Fig. 3**). The ABD disulfide cross-linking may impose structural constraints perturbing proper ABD clamshell closure, an effect that would oppose the enhanced gating efficacy. This effect may be particularly marked for the glycine-binding GluN1 ABD where the disulfide bridge inserts on the lower lobe. Alternatively, the conformational space explored by super-active mutants may exclude high agonist affinity desensitized states, rare states that may have been missed in our single-channel recordings. NMDARs show a complex structural and energetic landscape<sup>62</sup>, translating into a particularly complex kinetic behavior with multiple intermediate closed steps<sup>19,37,50,66</sup>. There is obviously still much to be learned about the structure-function relationships underlying this elaborate behavior. It is thus unclear how the vertical motion of the GluN1 ABD-TM3 linker impacts channel opening. What makes the NTD-ABD linkers so critical in the receptor's allostery<sup>24,25</sup> is also unknown. Finally, how the inter-dimer ABD rolling described here on GluN2B NMDARs compare to intra-dimer ABD motions previously described on GluN2A NMDARs<sup>32,67</sup> remains to be clarified. The availability of additional full-length structures of NMDARs, including in an active state, would certainly provide key insights into these questions.



## Online Methods

### Molecular Biology

The pcDNA3-based expression plasmids for rat GluN1-1a (named GluN1 herein), rat GluN2A and mouse  $\epsilon$ 2 (named GluN2B herein) subunits, site directed mutagenesis strategy and sequencing procedure have been described previously<sup>32</sup>. GluN1\* represents the GluN1-C744A-C798A double mutant.

### Two electrodes voltage-clamp (TEVC)

Recombinant NMDARs were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after coinjection of 37 nL of a mixture of cDNAs or mRNAs (at 30-60 ng/ $\mu$ l; nuclear injection for cDNAs) coding for various GluN1-1a and GluN2 subunits (ratio 1:1). mRNAs were obtained using mMACHINE mMESSAGE™ T7 Transcription Kit (Ambion™). Oocytes were prepared, injected, perfused and voltage clamped as previously described<sup>32</sup>. Data were collected and analyzed using pClamp 10.5 (Molecular Devices), and fitted using Sigmaplot 11.0 (SSPS) or Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software). Unless otherwise mentioned, error bars represent the s.d. of the mean value.

The standard external solution contained (in mM) 100 NaCl, 2.5 KCl, 0.3 BaCl<sub>2</sub>, and 5 HEPES, pH adjusted to 7.3 with NaOH. In all '0' zinc solutions, 10  $\mu$ M DTPA was added to chelate contaminating zinc<sup>68</sup>. Recordings were performed at a holding potential of -60 mV and at room temperature. NMDAR-mediated currents were induced by simultaneous application of saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100  $\mu$ M each). Glutamate and glycine dose-response curves (DRC) were performed in the presence of 100  $\mu$ M glycine and 100  $\mu$ M glutamate, respectively. Agonists dose-response curves were fitted with the following Hill equation:  $I_{rel} = 1/(1+(EC_{50}/[A])^{n_H})$ , where  $I_{rel}$  is the mean relative current, [A] the agonist concentration and  $n_H$  the Hill coefficient. EC<sub>50</sub> and  $n_H$  were fitted as free parameters. For zinc DRC on GluN1/GluN2A receptors, 10 mM tricine was used to buffer zinc<sup>68</sup>, and the following relationship was used to calculate the free zinc concentrations<sup>32,69</sup>:  $[Zn]_{free} = [Zn]_{added}/200$ . No zinc buffer was used for zinc DRC on GluN1/GluN2B receptors. Ifenprodil and zinc DRC were fitted with the following Hill equation:  $I_{rel} = 1-a/(1+(IC_{50}/[B])^{n_H})$ , where  $I_{rel}$  is the mean relative current, [B] the ifenprodil or free zinc concentration, (1-a) the maximal inhibition and  $n_H$  the Hill coefficient. IC<sub>50</sub>, a and  $n_H$  were fitted as free parameters except when fitting zinc sensitivity of GluN1/GluN2B receptors (a fixed to 1). For proton DRC, an external solution with increased HEPES concentration (40 mM) was used to insure proper pH buffering, corrections for small shifts in the reference potential of bath electrodes and analysis of the data were performed as previously described<sup>32</sup>. Spermine sensitivity was assessed at pH 6.3 to maximize the spermine-induced potentiation<sup>28</sup>.

## Redox treatment

To induce cleavage of disulfide bonds, oocytes were incubated for at least 15 min with DTE (dithioerythritol, 5 mM) in Barth solution (pH 8). To promote formation of disulfide bonds, oocytes were incubated for at least 10 min in DTNB (5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid], 0.5 mM) in Barth solution supplemented with DTPA (10  $\mu$ M). All redox treatments on whole oocytes were performed 'offline' (on non-impaled oocytes). Reversibility was calculated as  $(I_{DTE} - I_{DTNB}) / (I_{DTE} - I_{Initial})$  with  $I_{Initial}$  the initial current level,  $I_{DTE}$  the current level after DTE treatment and  $I_{DTNB}$  the current level after DTE and DTNB treatment.

## Patch-clamp recordings

### *Whole-cell recordings*

Recordings were performed using HEK293 cells transfected with GluN1, GluN2A or GluN2B and a separate GFP construct (0.5  $\mu$ g/ml each) using Polyethylenimine (Polyscience). All experiments were performed 24-48h post-transfection at room temperature. Currents were sampled at 10 kHz and low-pass filtered at 2 kHz using an Axopatch 200B amplifier and Clampfit 10.5 (Molecular Devices). Pipettes (thick-wall, borosilicate, Hilgenberg) were pulled and fire-polished achieving 3 to 5 M $\Omega$  resistances. At -60 mV, seal resistance ranged between 2 and 20 G $\Omega$ . The external solution contained (in mM): 140 NaCl, 10 HEPES, 2.8 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 20 sucrose, 0.01 DTPA, pH 7.3 (290-300 mOsm). The pipette solution contained (in mM): 110 D-Gluconate, 110 CsOH, 30 CsCl, 5 HEPES, 4 NaCl, 0.5 CaCl<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 5 BAPTA, 2 Na<sup>+</sup>-ATP, 0.3 Na<sup>+</sup>-GTP, pH 7.35 (270-280 mOsm). Agonists (100  $\mu$ M glycine and 100  $\mu$ M glutamate) and MK-801 (1  $\mu$ M) were applied using a multi-barrel fast perfusion exchanger (RSC-200; BioLogic). Recordings were performed at a holding potential of -60 mV.

### *Single-channel recordings*

Recordings were performed on HEK293 cells (cell-attached mode) transfected with GluN1 and GluN2A or GluN2B and a separate peGFP-C1 construct (at a ratio N1:N2:eGFP of 4:1.5:1 for GluN2A or 4:2.5:1 for GluN2B) using X-tremeGene HP (Roche). All experiments were performed 24-48h post-transfection at 21–24 °C. Currents were recorded using an integrating patch-clamp amplifier (Axopatch 200B, Molecular Devices), analog filtered at 10 kHz (four-pole Bessel filter), and digitized at 50 kHz (ITC-16 interfaced with PatchMaster, HEKA). Patch pipettes (thick-wall, borosilicate, Sutter Instruments) were pulled and fire-polished achieving resistances between 10 and 20 M $\Omega$  when measured in the bath. At -100 mV, seal resistance ranged between 2 and 20 G $\Omega$ . Cells were transferred to coverslips in a bath solution containing (in mM): 150 NaCl, 10 HEPES, 2.5 KCl, pH 8.0. Patch pipettes were filled with bath solution and 1 mM glutamate and 0.1 mM glycine. 0.05 mM EDTA was added

to minimize gating effects of divalent ions. Inward currents were elicited by applying a pipette potential of +100 mV.

### Single-channel analysis

Analysis of single-channel records was comparable to ref. 52. Briefly, after recordings were complete, data was exported from PatchMaster to QuB (<http://www.qub.buffalo.edu>) for processing (removal of unstable regions, defining baseline) and analysis. Processed data was idealized using the segmental k-means (SKM) algorithm. Kinetic analysis was performed using the maximum interval likelihood (MIL) algorithm in QuB with a dead time of 20  $\mu$ s. We used a linear, fully-liganded state model containing 3 closed states, 2 desensitized states and 2 open states to fit the data (see ref. 52 for details). For each individual record, state models with increasing closed (3 to 6) and open (2 to 4) states were constructed and fitted to the recordings until log-likelihood (LL) values improved by less than 10 LL units/added state or if the next added state showed 0% occupancy. All constructs and records were best fit by 5 closed states and 2 open states. Time constants and the relative areas of each component, the transition rate constants (forward,  $k_f$  and reverse,  $k_r$ ), as well as mean closed time (MCT) and mean open time (MOT), were averaged for each receptor. All analysis was done on patches that contained a single channel, which was clearly definable for all constructs given their high open probability. Kinetic analysis was done only on patches that had a minimum of 10,000 events and had low noise.

*Thermodynamic effects.* We quantified the Gibbs free energy of each transition using the following:

$$\Delta G = -RT \ln \left( \frac{k_f}{k_r} \right)$$

Where  $k_f$  and  $k_r$  refer to the forward and reverse rates of that transition, R is the empirical gas constant ( $1.987 \times 10^{-3}$  kcal/mol), and T is the recording temperature (295 Kelvin).

### MK-801 inhibition

MK-801 is an open channel blocker (that is, blocker action requires prior channel gate opening) with slow reversibility, and consequently, the rate at which MK-801 inhibits NMDAR responses depends on the level of channel activity, that is, channel open probability ( $P_o$ )<sup>70-72</sup>. Based on this principle, MK-801 is classically used to estimate the level of NMDAR channel activity in macroscopic whole-cell recordings (see, for instance refs. 24, 29, 73 and 74). Note, however, that MK-801 inhibition kinetics can index relative, not absolute,  $P_o$ . Final solutions containing MK-801 (10 nM at pH 7.3 and 30 nM at pH 8 for oocytes experiments, 1  $\mu$ M for HEK cells) were prepared by dilution of the stock solutions into the agonist-containing solution. MK-801 inhibition time constants ( $\tau_{on}$ ) were obtained by fitting currents with a single-exponential component within a time window corresponding to 10-90 % of the maximal

inhibition. Recovery from inhibition was also measured for GluN1-E698C/GluN2B-L795C and GluN1-E698C/GluN2A-L794C because its rate was high enough for substantial recovery in a reasonable delay. On-rate ( $k_{on}$ ) and off-rate ( $k_{off}$ ) constants were then calculated with a first order reaction scheme:  $k_{on} = 1/([MK-801] \cdot \tau_{on})$  and  $k_{off} = 1/\tau_{off}$ . Each constant was then normalized to the mean constant of the corresponding wild-type receptors measured in the same conditions on the same day.

## Immunoblotting

For each condition, sixteen oocytes were selected based on their high level of NMDAR expression as assessed by TEVC recordings. Selected oocytes were instantly frozen in liquid nitrogen for later use. Oocytes expressing 'silent' mutant receptors were selected based on redox treatment of other oocytes of the same batch revealing high expression of 'silent' receptors. Each mix of 16 oocytes was then homogenized on ice by back and forth pipetting with 160  $\mu$ L of lysis buffer (20 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 % DDM, 1/20 of a complete protease inhibitor cocktail tablet Roche Complete, Mini) until a homogenous suspension was obtained. The samples were then centrifuged (15000 g for 8 min at 4°C), re-homogenized and centrifuged again. Supernatants enriched in membrane proteins were collected and separated in two equal volumes for subsequent western blotting experiments in non-reducing and reducing (9% vol/vol  $\beta$ -mercaptoethanol added in the loading buffer) conditions. Samples were separated on 3-8% SDS-PAGE gradient gels (4 oocytes per lane), semi-dry transferred to nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-GluN1 antibody (1:750, mouse monoclonal MAB1586 clone R1JHL, Millipore) or anti-GluN2B antibody (1:500, mouse monoclonal 75-101 clone N59/36, NeuroMab). Protein bands were visualized using secondary goat peroxidase-linked anti-mouse antibodies (1:10000, Jackson ImmunoResearch), with the SuperSignal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific™).

## Chemicals

Salts (including  $ZnCl_2$ ), DTPA, tricine, DTE, DTNB and spermine were purchased from Sigma-Aldrich. A stock solution of DTNB was prepared at 50 mM in 500 mM HEPES pH 8.0. DTPA was prepared as 10 mM aliquots at pH 7.3. Ifenprodil (generous gift from Synthélabo, France) was prepared as 10 mM stock aliquots in 1% HCl. MK-801 (Ascent Scientific) was prepared as 50  $\mu$ M aliquots.

## Molecular modeling and fitting

A 3D model of full length GluN1/GluN2B NMDAR representing an inhibited state based on the best resolved parts of the pDBs 4TLL, 4TLM<sup>15</sup> and 4PE5<sup>14</sup> was initially produced using Modeller<sup>75</sup>, with rat (GluN1) and mouse (GluN2B) protein sequences and reconstruction of

missing loops and sidechains. To obtain complete templates of different states of the receptor, the model was then fitted using iMODfit<sup>46</sup> to the following target cryo-EM maps: EMD-8098<sup>16</sup> for the agonist-bound inhibited state (in complex with glutamate, glycine and the GluN2B antagonist Ro-256981), EMD-8106<sup>16</sup> for the 'resting-like' DCKA/D-APV-bound state, EMD-3352<sup>17</sup> for the putative active state (in complex with glutamate and glycine; TMD region not resolved), and EMD-3354<sup>17</sup> for the agonist-bound non-active state (in complex with glutamate and glycine but ion channel pore is closed).

To gain insight in the transitions between those 4 states, each one of the 4 templates obtained was then fitted again using the cryo-EM maps of the 3 other states as target. The transition from the inhibited state to EMD-3352 is presented extensively. Control runs modifying the EM map threshold (<cutoff> parameter), the range of modes (-n option), or fixing secondary elements dihedral (-S option) showed that results were robust and that the best fitting were obtained with default program options. In all runs targeting EMD-3352, we used the volume eraser option of UCSF Chimera<sup>76</sup> to erase the density of the poorly resolved TMD region. This procedure allowed to avoid detergent density influence in fitting, and therefore, only the density of the extracellular part of the receptor as target could be used. We performed control fittings by erasing the TMD on cryo-EM maps of other states to ensure that pore opening was not a mere artifact of TMD density erasing.

Trajectory analysis was performed using the R package Bio3D<sup>77</sup>. 43 collective variables were measured among which i) the ABD-TMD linker 'tension', measured for GluN1 as the distance between the center of masses of both GluN1-R663 residues and the center of masses of the four SYTANLAAF sequences, and for GluN2B as the GluN2B-E658 – Glu2B-E658 distance; ii) the ABD 'rolling', measured as the dihedral angle between a vector defined by the center of masses of an ABD domain lower and upper lobes and the equivalent vector of the opposite domain. The volume of the ifenprodil binding pocket<sup>27</sup> was calculated as the volume of the non-clashing part of a 7 Å sphere centered at equal distance of GluN1-G112 and GluN2B-Q110. Because of the two-fold symmetry of the receptor extracellular region, distance between the center of masses of the lower lobes of the NTD dimers, volume of the ifenprodil pocket, extent of ABD rolling and distances between the GluN1 ABD loop and the GluN2 NTD can be measured two times independently on the tetrameric receptor. A mean value of both measures was taken after verifying that they were not significantly different.

### Structure illustrations

The figures were prepared with PyMOL (<http://pymol.org>) using either our whole-receptor (-CTD) model (based on PDB 4PE5, 4TLL and 4TLM<sup>14,15</sup>), iMODfit-based simulations (targeting cryo-EM map EMD-3352<sup>17</sup>) or cryo-EM-based PDBs 5FXG<sup>17</sup> and 5IOV<sup>16</sup>.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the French government ('Investissements d'Avenir' ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE, ANR-11-IDEX-0001-02 PSL Research University, ANR-11-LABX-0011-01), the European Research Council (ERC Advanced Grant #693021 to PP) and grants from the National Institutes of Health (NS 088479 to LPW and F30-MH115618 to KC). We thank Jose Ramon Lopez Blanco for his assistance with iMODFIT and Jérôme Hénin for his assistance in the measure of dihedral angles.

## **Author Contributions**

JBE, DS and TG designed and performed all experiments except the single-channel recordings which were performed by KC. JBE, DS and AT performed the iMODfit analysis. MD provided technical help in molecular biology. KC and LPW analyzed the single-channel recordings. DS, AT and PP supervised the work and participated in data analysis. JBE and PP wrote the manuscript, with help from all authors.

## **Competing Financial Interests statement**

The authors declare no competing financial interests.

## References

1. Monod, J., Wyman, J. & Changeux, J.P. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* **12**, 88-118 (1965).
2. Changeux, J.P. & Christopoulos, A. Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation. *Cell* **166**, 1084-1102 (2016).
3. Foster, D.J. & Conn, P.J. Allosteric Modulation of GPCRs: New Insights and Potential Utility for Treatment of Schizophrenia and Other CNS Disorders. *Neuron* **94**, 431-446 (2017).
4. Lemoine, D. et al. Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem Rev* **112**, 6285-318 (2012).
5. Smart, T.G. & Paoletti, P. Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**(2012).
6. Mony, L., Kew, J.N., Gunthorpe, M.J. & Paoletti, P. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* **157**, 1301-17 (2009).
7. Taly, A., Corringer, P.J., Guedin, D., Lestage, P. & Changeux, J.P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 733-50 (2009).
8. Nemezc, A., Prevost, M.S., Menny, A. & Corringer, P.J. Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* **90**, 452-70 (2016).
9. Traynelis, S.F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* **62**, 405-96 (2010).
10. Zhu, S. & Paoletti, P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms. *Curr Opin Pharmacol* **20**, 14-23 (2015).
11. Kumar, J. & Mayer, M.L. Functional insights from glutamate receptor ion channel structures. *Annu Rev Physiol* **75**, 313-37 (2013).
12. Dawe, G.B., Aurousseau, M.R., Daniels, B.A. & Bowie, D. Retour aux sources: defining the structural basis of glutamate receptor activation. *J Physiol* **593**, 97-110 (2015).
13. Greger, I.H., Watson, J.F. & Cull-Candy, S.G. Structural and Functional Architecture of AMPA-Type Glutamate Receptors and Their Auxiliary Proteins. *Neuron* **94**, 713-730 (2017).
14. Karakas, E. & Furukawa, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science* **344**, 992-7 (2014).
15. Lee, C.H. et al. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature* **511**, 191-7 (2014).
16. Zhu, S. et al. Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation. *Cell* **165**, 704-14 (2016).
17. Tajima, N. et al. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature* **534**, 63-8 (2016).
18. Lu, W., Du, J., Goehring, A. & Gouaux, E. Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Science* **355**(2017).
19. Zhou, H.X. & Wollmuth, L.P. Advancing NMDA Receptor Physiology by Integrating Multiple Approaches. *Trends Neurosci* **40**, 129-137 (2017).

20. Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P. & Gouaux, E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* **462**, 745-56 (2009).
21. Meyerson, J.R. et al. Structural basis of kainate subtype glutamate receptor desensitization. *Nature* **537**, 567-571 (2016).
22. Meyerson, J.R. et al. Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization. *Nature* (2014).
23. Twomey, E.C., Yelshanskaya, M.V., Grassucci, R.A., Frank, J. & Sobolevsky, A.I. Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors. *Nature* **549**, 60-65 (2017).
24. Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J.W. & Paoletti, P. Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* **459**, 703-7 (2009).
25. Yuan, H., Hansen, K.B., Vance, K.M., Ogden, K.K. & Traynelis, S.F. Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J Neurosci* **29**, 12045-58 (2009).
26. Hansen, K.B., Furukawa, H. & Traynelis, S.F. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol Pharmacol* **78**, 535-49 (2010).
27. Karakas, E., Simorowski, N. & Furukawa, H. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* **475**, 249-53 (2011).
28. Mony, L., Zhu, S., Carvalho, S. & Paoletti, P. Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* **30**, 3134-46 (2011).
29. Zhu, S., Stroebel, D., Yao, C.A., Taly, A. & Paoletti, P. Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 477-85 (2013).
30. Romero-Hernandez, A., Simorowski, N., Karakas, E. & Furukawa, H. Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain. *Neuron* **92**, 1324-1336 (2016).
31. Furukawa, H., Singh, S.K., Mancusso, R. & Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**, 185-92 (2005).
32. Gielen, M. et al. Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57**, 80-93 (2008).
33. Regan, M.C., Romero-Hernandez, A. & Furukawa, H. A structural biology perspective on NMDA receptor pharmacology and function. *Curr Opin Struct Biol* **33**, 68-75 (2015).
34. Careaga, C.L. & Falke, J.J. Thermal motions of surface alpha-helices in the D-galactose chemosensory receptor. Detection by disulfide trapping. *J Mol Biol* **226**, 1219-35 (1992).
35. Sullivan, J.M. et al. Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* **13**, 929-36 (1994).
36. Riou, M., Stroebel, D., Edwardson, J.M. & Paoletti, P. An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PLoS One* **7**, e35134 (2012).
37. Erreger, K., Dravid, S.M., Banke, T.G., Wyllie, D.J. & Traynelis, S.F. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol* **563**, 345-58 (2005).
38. Paoletti, P. Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* **33**, 1351-65 (2011).
39. Dong, H. & Zhou, H.X. Atomistic mechanism for the activation and desensitization of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nat Commun* **2**, 354 (2011).



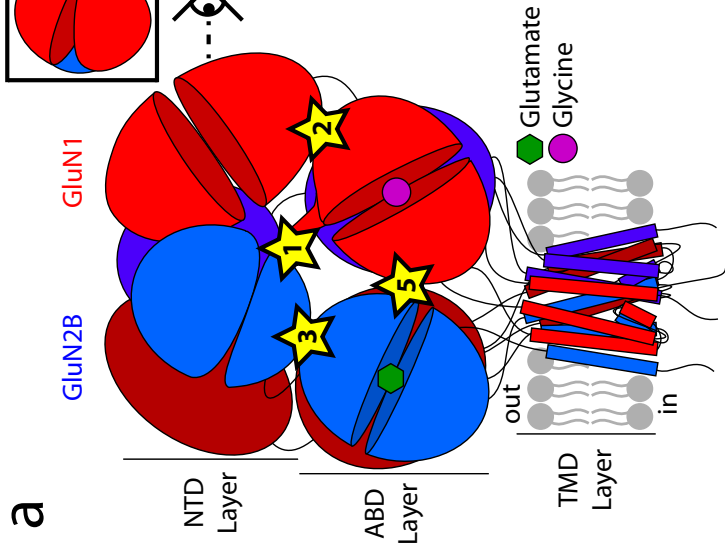
40. Dutta, A. et al. Cooperative Dynamics of Intact AMPA and NMDA Glutamate Receptors: Similarities and Subfamily-Specific Differences. *Structure* **23**, 1692-704 (2015).
41. Dutta, A., Shrivastava, I.H., Sukumaran, M., Greger, I.H. & Bahar, I. Comparative dynamics of NMDA- and AMPA-glutamate receptor N-terminal domains. *Structure* **20**, 1838-49 (2012).
42. Dai, J. & Zhou, H.X. An NMDA receptor gating mechanism developed from MD simulations reveals molecular details underlying subunit-specific contributions. *Biophys J* **104**, 2170-81 (2013).
43. Krieger, J., Bahar, I. & Greger, I.H. Structure, Dynamics, and Allosteric Potential of Ionotropic Glutamate Receptor N-Terminal Domains. *Biophys J* **109**, 1136-48 (2015).
44. Pang, X. & Zhou, H.X. Structural modeling for the open state of an NMDA receptor. *J Struct Biol* **200**, 369-375 (2017).
45. Zheng, W., Wen, H., Iacubucci, G.J. & Popescu, G.K. Probing the Structural Dynamics of the NMDA Receptor Activation by Coarse-Grained Modeling. *Biophys J* **112**, 2589-2601 (2017).
46. Lopez-Blanco, J.R. & Chacon, P. iMODFIT: efficient and robust flexible fitting based on vibrational analysis in internal coordinates. *J Struct Biol* **184**, 261-70 (2013).
47. Gatsogiannis, C. et al. Membrane insertion of a Tc toxin in near-atomic detail. *Nat Struct Mol Biol* **23**, 884-890 (2016).
48. Poepsel, S., Kasinath, V. & Nogales, E. Cryo-EM structures of PRC2 simultaneously engaged with two functionally distinct nucleosomes. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 154-162 (2018).
49. Newcombe, J., Chatzidaki, A., Sheppard, T.D., Topf, M. & Millar, N.S. Diversity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Positive Allosteric Modulators Revealed by Mutagenesis and a Revised Structural Model. *Mol Pharmacol* **93**, 128-140 (2018).
50. Popescu, G. & Auerbach, A. The NMDA receptor gating machine: lessons from single channels. *Neuroscientist* **10**, 192-8 (2004).
51. Popescu, G. & Auerbach, A. Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response. *Nat Neurosci* **6**, 476-83 (2003).
52. Kazi, R., Dai, J., Sweeney, C., Zhou, H.X. & Wollmuth, L.P. Mechanical coupling maintains the fidelity of NMDA receptor-mediated currents. *Nat Neurosci* **17**, 914-22 (2014).
53. Herguedas, B., Krieger, J. & Greger, I.H. Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci* **117**, 361-86 (2013).
54. Paganelli, M.A., Kussius, C.L. & Popescu, G.K. Role of cross-cleft contacts in NMDA receptor gating. *PLoS One* **8**, e80953 (2013).
55. Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J. & Paoletti, P. The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* **25**, 308-17 (2005).
56. Qiu, S. et al. An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* **284**, 20285-98 (2009).
57. Ogden, K.K. & Traynelis, S.F. Contribution of the M1 transmembrane helix and pre-M1 region to positive allosteric modulation and gating of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **83**, 1045-56 (2013).

58. Khatri, A. et al. Structural determinants and mechanism of action of a GluN2C-selective NMDA receptor positive allosteric modulator. *Mol Pharmacol* **86**, 548-60 (2014).
59. Regan, M.C. et al. Structural Mechanism of Functional Modulation by Gene Splicing in NMDA Receptors. *Neuron* (2018).
60. Amico-Ruvio, S.A., Paganelli, M.A., Myers, J.M. & Popescu, G.K. Ifenprodil effects on GluN2B-containing glutamate receptors. *Mol Pharmacol* **82**, 1074-81 (2012).
61. Amico-Ruvio, S.A., Murthy, S.E., Smith, T.P. & Popescu, G.K. Zinc effects on NMDA receptor gating kinetics. *Biophys J* **100**, 1910-8 (2011).
62. Dolino, D.M. et al. The structure-energy landscape of NMDA receptor gating. *Nat Chem Biol* **13**, 1232-1238 (2017).
63. Durr, K.L. et al. Structure and Dynamics of AMPA Receptor GluA2 in Resting, Pre-Open, and Desensitized States. *Cell* **158**, 778-92 (2014).
64. Lau, A.Y. et al. A conformational intermediate in glutamate receptor activation. *Neuron* **79**, 492-503 (2013).
65. Salazar, H., Eibl, C., Chebli, M. & Plested, A. Mechanism of partial agonism in AMPA-type glutamate receptors. *Nat Commun* **8**, 14327 (2017).
66. Schorge, S., Elenes, S. & Colquhoun, D. Maximum likelihood fitting of single channel NMDA activity with a mechanism composed of independent dimers of subunits. *J Physiol* **569**, 395-418 (2005).
67. Borschel, W.F., Murthy, S.E., Kasperek, E.M. & Popescu, G.K. NMDA receptor activation requires remodelling of intersubunit contacts within ligand-binding heterodimers. *Nat Commun* **2**, 498 (2011).
68. Paoletti, P., Ascher, P. & Neyton, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**, 5711-25 (1997).
69. Fayyazuddin, A., Villarroel, A., Le Goff, A., Lerma, J. & Neyton, J. Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn<sup>2+</sup> binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**, 683-94 (2000).
70. Huettner, J.E. & Bean, B.P. Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 1307-11 (1988).
71. Jahr, C.E. High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate. *Science* **255**, 470-2 (1992).
72. Rosenmund, C., Clements, J.D. & Westbrook, G.L. Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse. *Science* **262**, 754-7 (1993).
73. Talukder, I., Borker, P. & Wollmuth, L.P. Specific sites within the ligand-binding domain and ion channel linkers modulate NMDA receptor gating. *J Neurosci* **30**, 11792-804 (2010).
74. Hansen, K.B. et al. Structural determinants of agonist efficacy at the glutamate binding site of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **84**, 114-27 (2013).
75. Eswar, N. et al. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 5**, Unit-5 6 (2006).
76. Pettersen, E.F. et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* **25**, 1605-12 (2004).
77. Grant, B.J., Rodrigues, A.P., ElSawy, K.M., McCammon, J.A. & Caves, L.S. Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. *Bioinformatics* **22**, 2695-6 (2006).

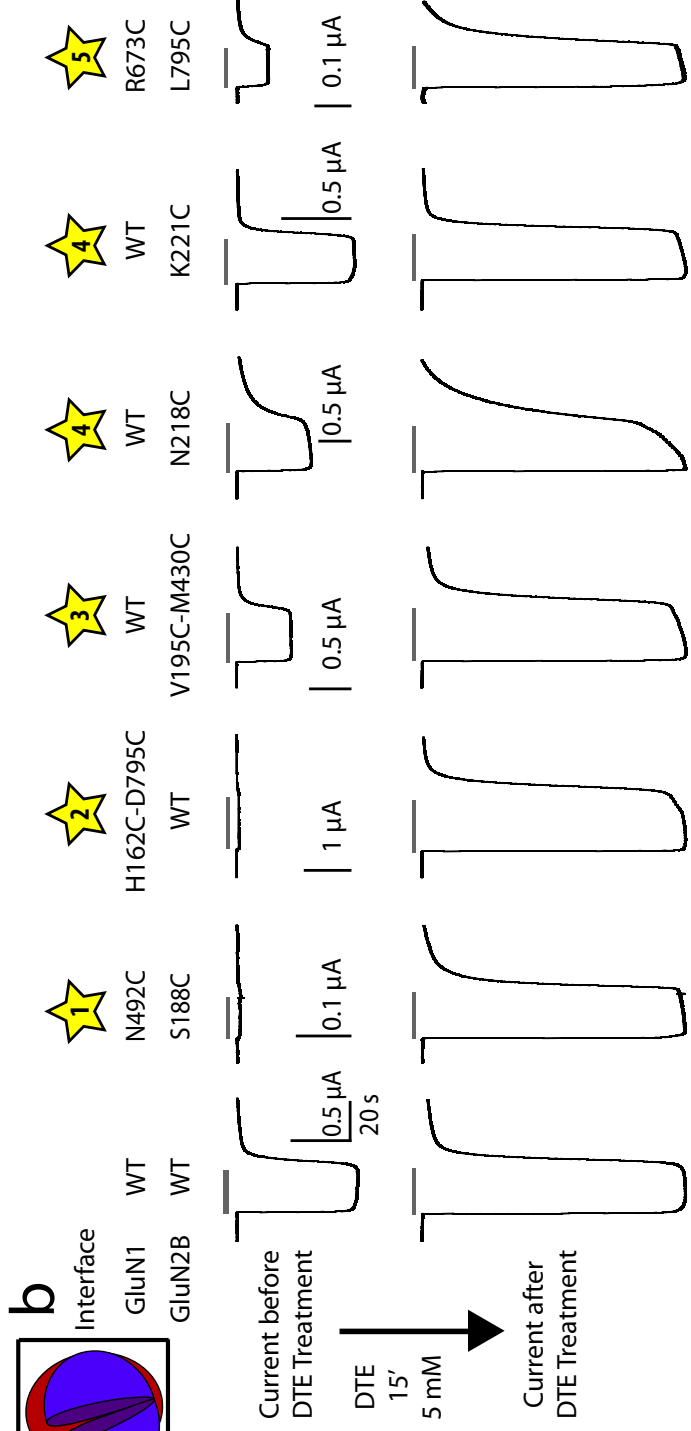
**Figure 1: NMDAR activation requires conformational mobility at inter-domain and inter-layer interfaces.**

(a) Schematic representation of a full-length GluN1/GluN2B NMDAR. The receptor displays a layered architecture. NTD, N-terminal domain; ABD; agonist-binding domain; TMD, transmembrane domain. The studied inter-domain and inter-layer interfaces are reported with numbered yellow stars. For clarity, interface 4 is shown from a side view (inset). (b) Representative current traces from oocytes expressing wild-type (WT) and double cysteine mutant NMDARs before and after DTE treatment. (c) Summary of the DTE-induced potentiation of WT and double cysteine mutants. Mean and n values are given in **Supplementary Table 1**. \*\*\*P < 0.001, one-way ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis H test) followed by Bonferroni corrected Dunn's test. (d) Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wt or mutant subunits. M1 indicates the GluN1 monomer (~110 kDa); M2 the GluN2B monomer (~180 kDa); D1/1 the GluN1 homodimer (~220 kDa); and D1/2 the GluN1/GluN2B heterodimer (~290 kDa). Lower panels: immunoblots in reducing conditions (+  $\beta$ -mercaptoethanol). N.I., non-injected oocytes.

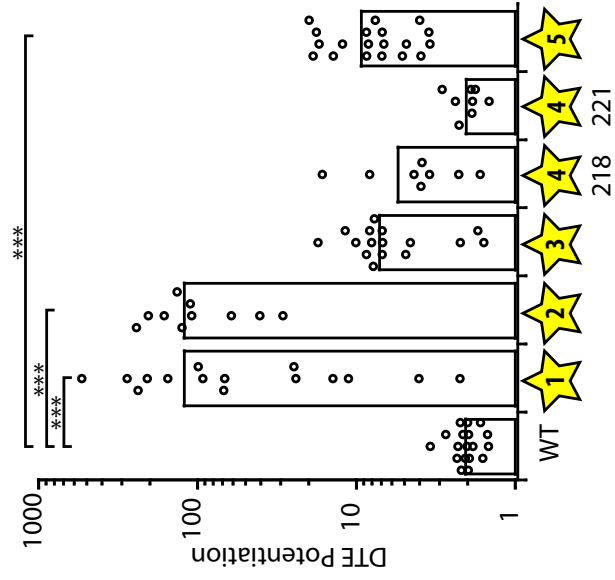
# a



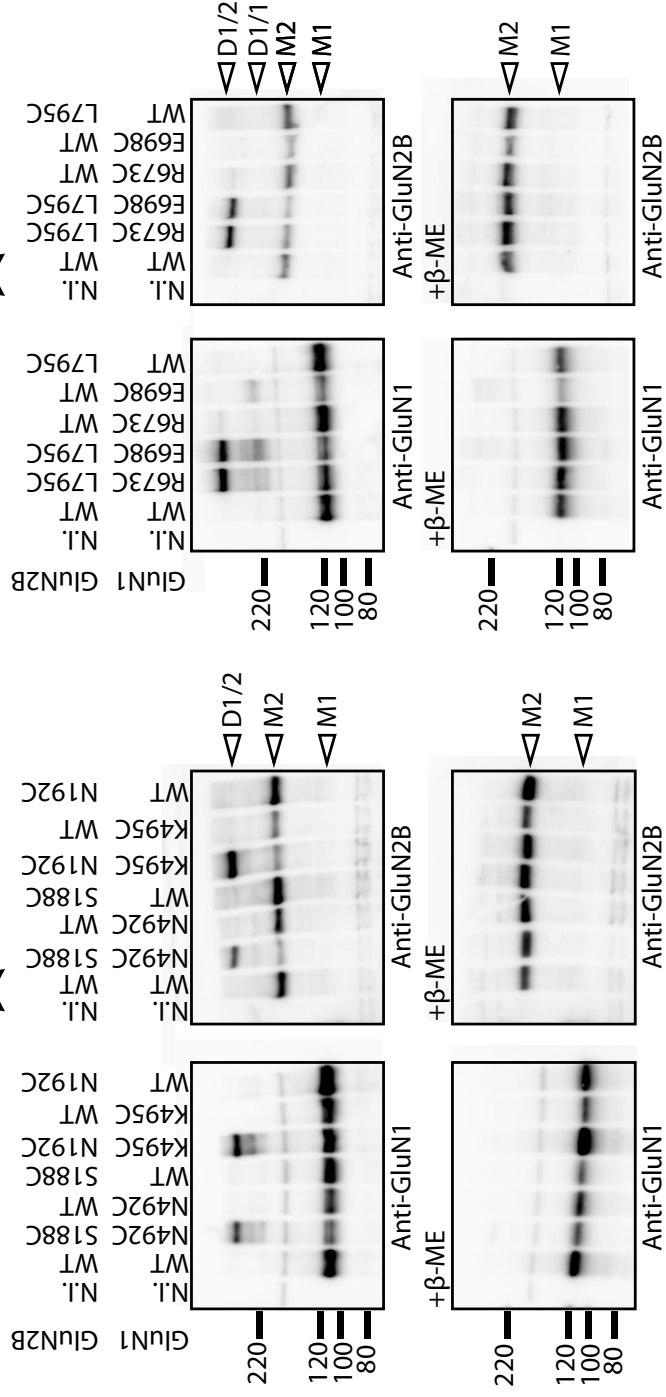
# b



# c

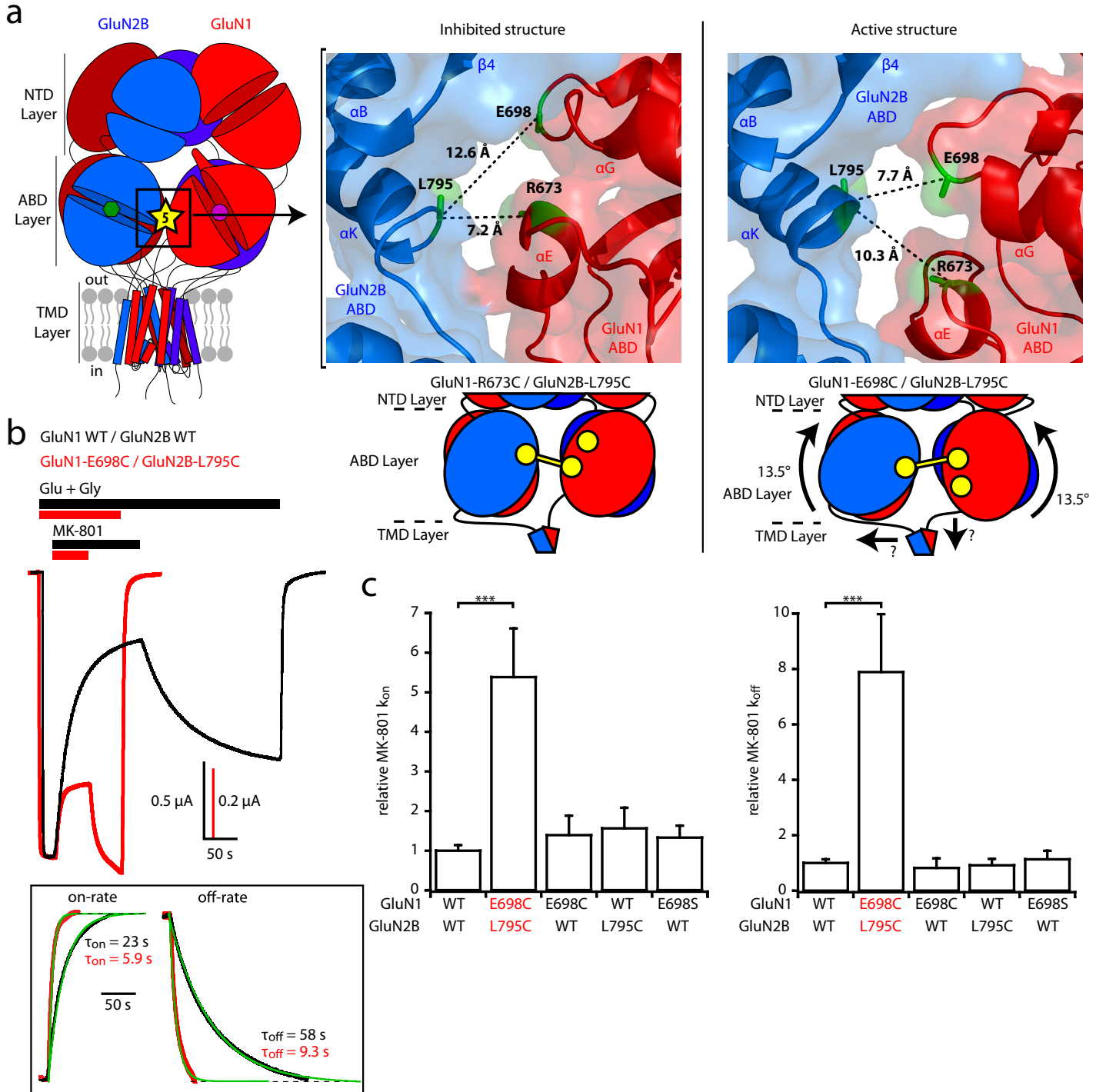


# d



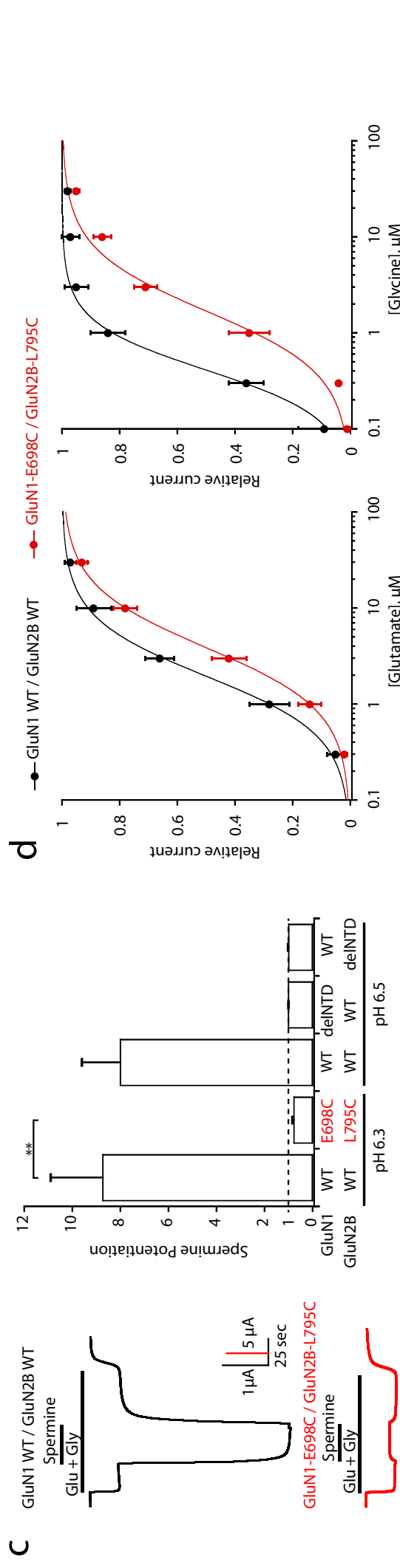
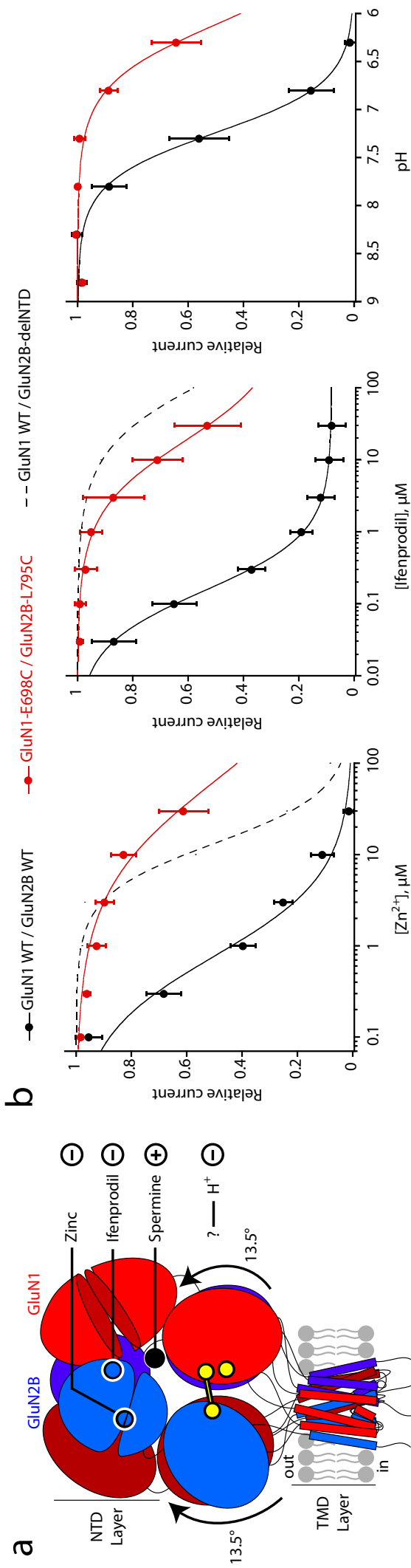
**Figure 2: Rolling between the two constitutive ABD dimers boosts receptor activity.**

(a) Left, localization of site 5 at the interface between the two constitutive ABD dimers. Right top, crystal structures of the inhibited (PDB 5IOV)<sup>16</sup> and active (5FXG)<sup>17</sup> states illustrating the differences in distances between GluN2B-L795 and GluN1-E698 or GluN1-R673 at interface 5. Those three residues are colored green, while GluN1 and GluN2B subunits are colored red and blue respectively. Right bottom, schematic representation of the GluN1-R673C/GluN2B-L795C disulfide cross-link capturing an inhibited state of the receptor, and of the GluN1-E698C/GluN2B-L795C disulfide cross-link trapping the rolling motion. (b) Assessment of receptor channel activity using MK-801 inhibition kinetics. Representative current traces from oocytes expressing either wild-type (WT) or GluN1-E698C/GluN2B-L795C mutant receptors in response to 10 nM MK-801 during agonist application. Responses were scaled to the current amplitude obtained before MK-801 application. Inset, mono-exponential fits of MK-801 wash-in and wash-out. Note the strikingly faster kinetics in mutant receptors, both at the onset and offset of MK-801. (c) Relative MK-801 inhibition on- and off-rate constants ( $k_{on}$  and  $k_{off}$ ). All values were normalized to the value obtained for WT GluN1/GluN2B receptors. Mean and n values are given in **Supplementary Table 2**. \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD.



**Figure 3: Super-active receptors are insensitive to allosteric modulation.**

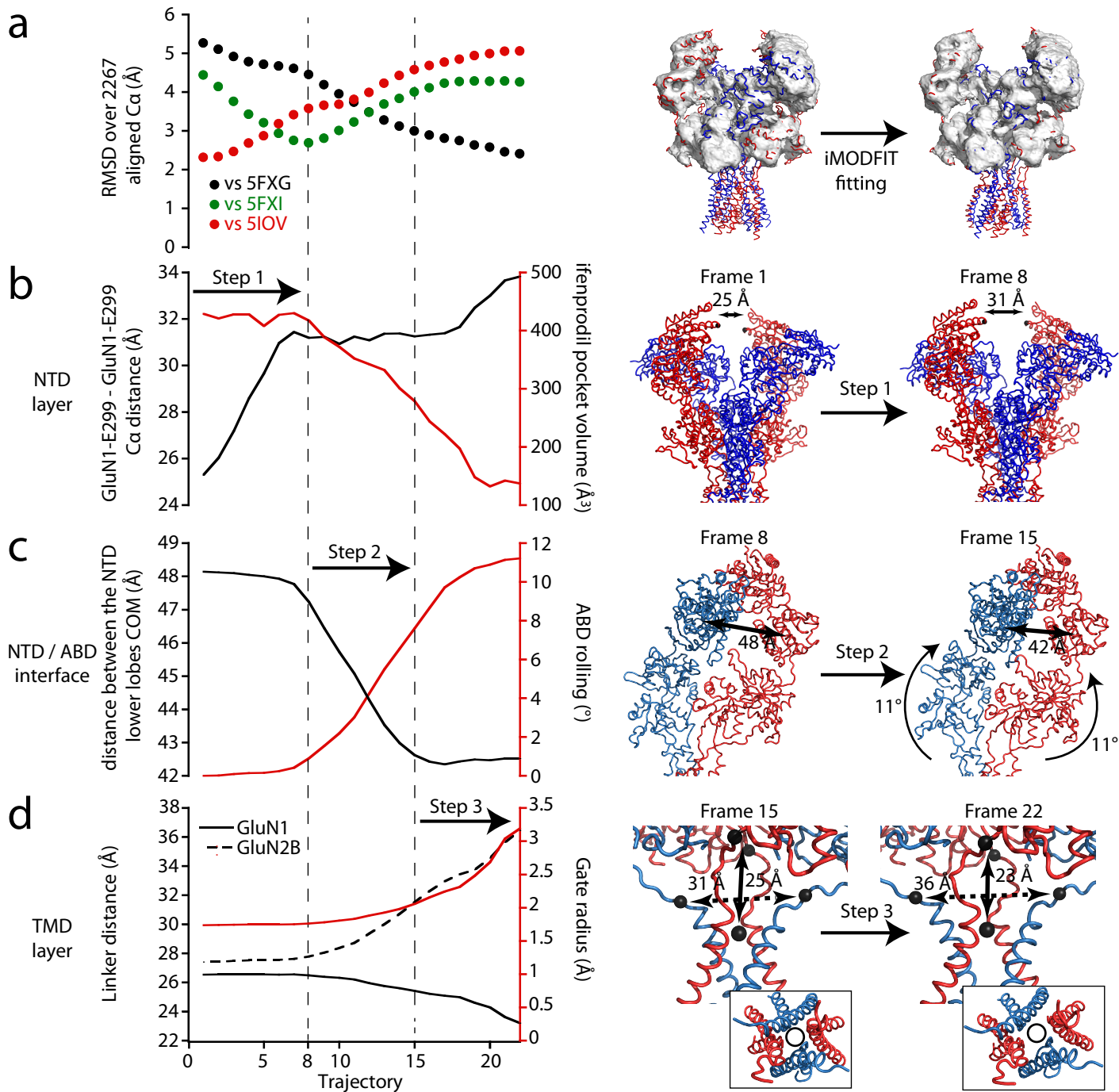
(a) Schematic representation of the super-active GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptor locked in the 'rolled' conformation, showing the NTD binding sites for spermine, zinc and ifenprodil, positive (+) and negative (-) allosteric modulators, respectively. Open circles indicate that the binding site is on the other side of the GluN2B NTD. The allosteric inhibitor  $H^+$  is also indicated, although its binding site remains ill-defined. (b) Zinc, ifenprodil and pH dose-response curves of wild-type (WT) GluN1/GluN2B receptors and mutant GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors. For comparison, zinc and ifenprodil dose-response curves of GluN1/GluN2B receptors lacking the whole GluN2B NTD (GluN1 WT/GluN2B-delNTD) are also shown (dashed lines; data from ref. 55). (c) Spermine (200  $\mu$ M, pH 6.3) potentiation of WT GluN1/GluN2B and mutant GluN1-E698C/GluN-L795C receptors. Spermine (200  $\mu$ M, pH 6.5) sensitivity is also shown for WT GluN1/GluN2B receptors and receptors lacking either the GluN1 (GluN1-delNTD/GluN2B WT) or GluN2B (GluN1 WT/GluN2B-delNTD) NTD (data from ref. 28). \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD. (d) Glutamate and glycine dose-response curves of WT GluN1/GluN2B receptors and mutant GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors. Values of  $IC_{50}$ , maximal inhibition (for zinc, ifenprodil and pH),  $EC_{50}$  (for glutamate and glycine), Hill coefficient (for all curves), mean (for spermine) and n are given in **Supplementary Table 3**.





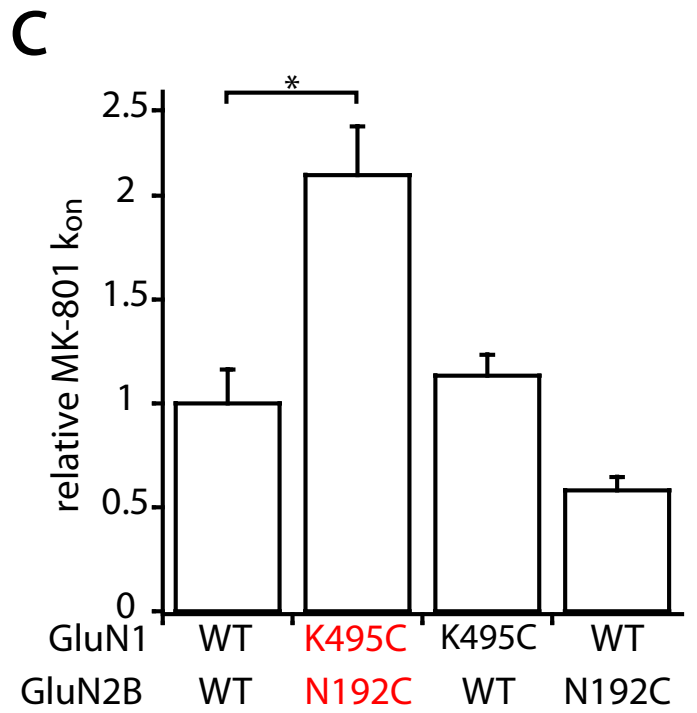
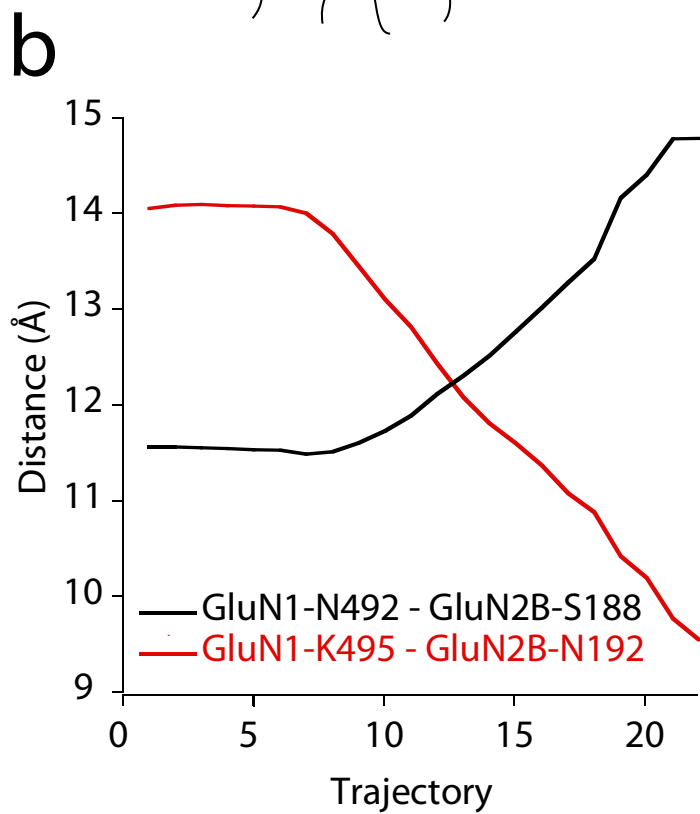
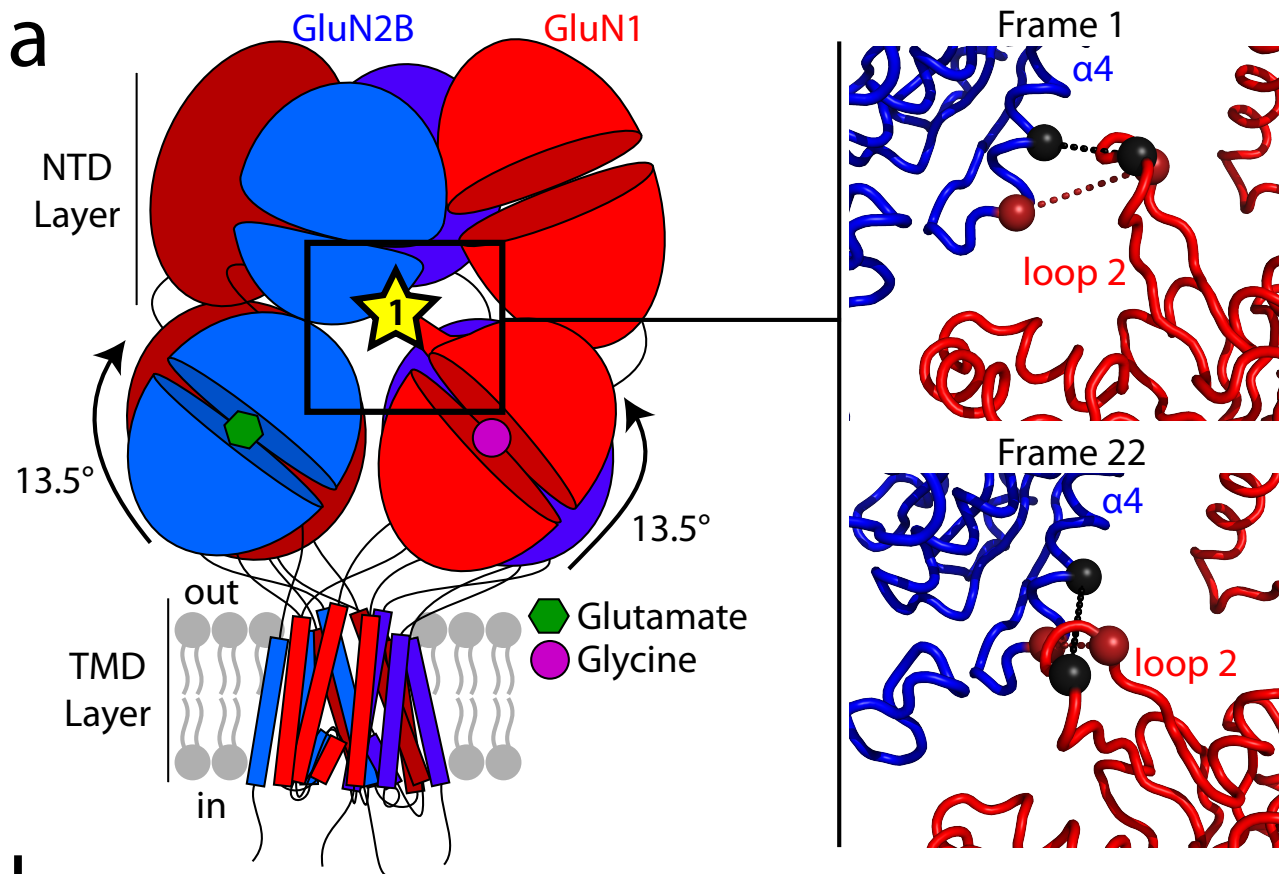
**Figure 4: Rolling mediates inter-layer coupling and facilitates pore opening.**

(a) iMODfit fitting of the GluN1/GluN2B inhibited state into the cryo-EM map EMD-3352 (target structure in a putatively active state; TMD not resolved). Left, Evolution of the RMSD calculated against PDBs 5FXG (putative active state), 5FXI (non-active state) and 5IOV (inhibited state) over 2267 aligned C $\alpha$ . The trajectory is divided in three steps (vertical dashed lines). Right, illustration of the fitting by superposition of the target EM density map (envelope representation) and the initial and final frames of the trajectory (line representation). GluN1 and GluN2B subunits are colored red and blue, respectively. (b-d) Left, evolution of selected collective variables during the iMODfit simulation. Each plot illustrates two collective variables, each with its own Y-axis (black or red). The upper panel (b) focuses on the NTD region (distance between the two GluN1 NTDs at the 'apex' of the receptor; volume of the ifenprodil binding pocket at the interface between GluN1 and GluN2B NTDs), the middle panel (c) on the distance between NTD lower lobes and the ABD rolling motion, and the lower panel (d) on the ABD-TMD connection and the M3 channel gate dilation. Right, illustration of the three steps of the fitting showing in step 1 (frame 1 to 8) the reduction of the inter NTD dimer distance; in step 2 (frame 8 to 15) the NTD lower lobes getting closer and the associated rolling of the ABD dimers; in step 3 (frame 15 to 22) the distance changes in the ABD-M3 linker and the channel gate radius. The inset highlights a top view of the pore lining helices M2 (P-loop) and M3 with a same-size circle emphasizing pore dilation during step 3. The GluN1 linker distance represents the distance between the center of masses (COM) of both GluN1-R663 residues and the COM of the M3 SYTANLAAF sequence residues, GluN2B linker distance represents the distance between both GluN2B-E658 residues.



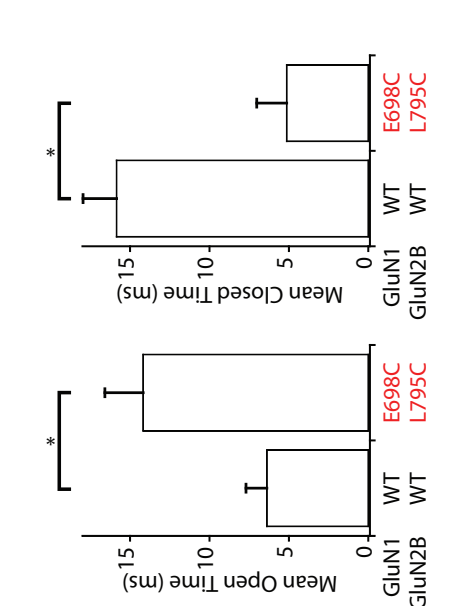
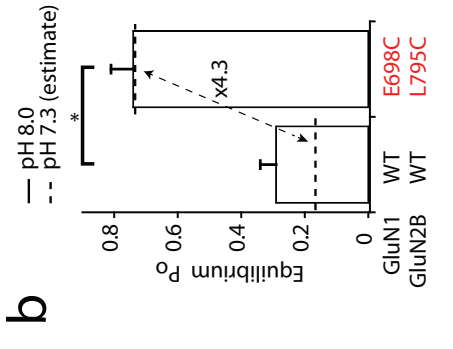
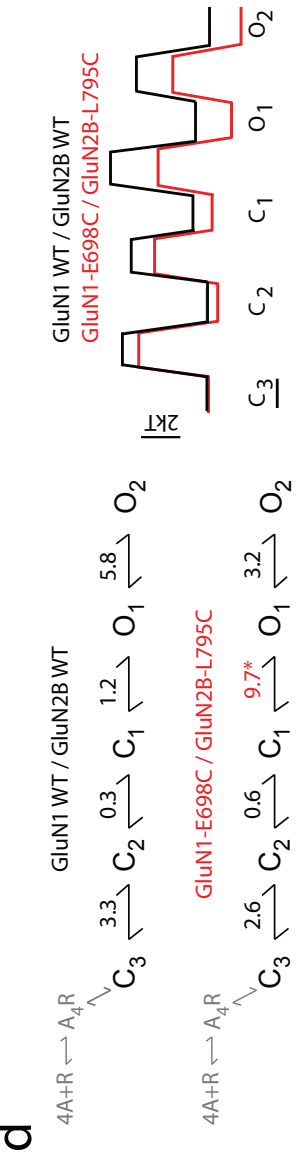
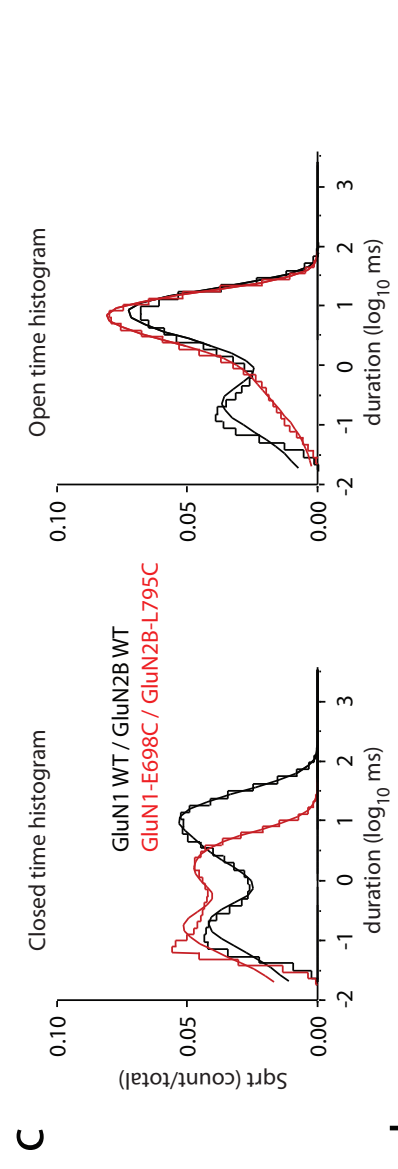
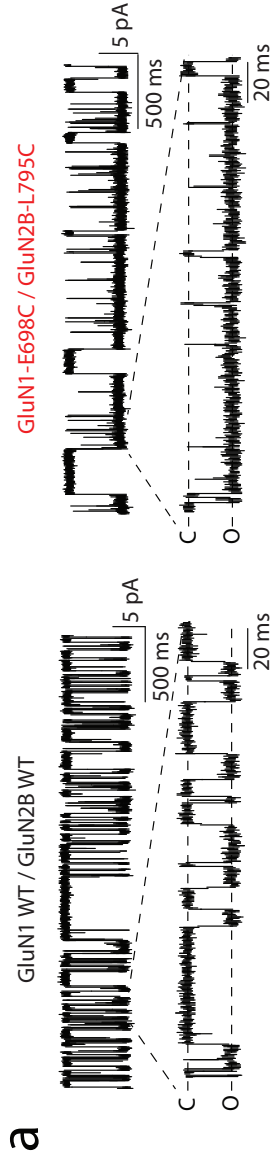
**Figure 5: Structural mobility of an inter-layer GluN1 protruding loop during rolling.**

(a) Left, localization of interface 1 between GluN1 ABD and GluN2B NTD. This interface involves a GluN1 specific loop that protrudes from GluN1 ABD upper lobe towards GluN2B NTD lower lobe. Right, Initial and final frames of the fitting presented in **Fig. 4.** at interface 1. The two pairs of residues targeted for cysteine mutations GluN1-N492/GluN2B-S188 and GluN1-K495/GluN2B-N192 are shown as spheres linked by a dotted line colored black and red, respectively. (b) Evolution of C $\alpha$ -C $\alpha$  distances of the two pairs of residues GluN1-N492/GluN2B-S188 and GluN1-K495/GluN2B-N192 during the fitting. (c) MK-801 inhibition kinetics. On-rate constants ( $k_{on}$ ) of inhibition by 10 nM MK-801 on wild-type (WT) and mutant receptors. All values are normalized to that obtained for WT GluN1/GluN2B receptors. Values of Mean and n are given in **Supplementary Table 2** \*P<0.05, one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD.



**Figure 6: Influence of rolling on single-receptor gating kinetics.**

(a) Representative recordings of patches containing one single wild-type (WT) or GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptor. The bottom trace is an expanded view. C, closed channel; O, open channel. (b) Single channel properties (equilibrium channel open probability, mean open time, mean closed time) of the WT and super-active GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors. Mean and n values are given in **Supplementary Table 4**. \* $P < 0.05$ , two-tailed Student's *t*-test, unpaired. Error bars, SEM. (c) Closed (*left*) and open (*right*) time histograms for WT (*upper panels*) or super-active GluN1-E698C/GluN2B-L795C (*lower panels*) receptors. Closed time histograms were best fit with 5 exponentials, whereas open time histograms were best fit with 2 exponentials (see Online Methods and **Supplementary Figure 6**). Smooth lines are associated exponential fits. *Insets*, mean closed and open state durations ( $\tau$ , ms) and occupancies ( $\alpha$ , %) (**Supplementary Figure 6**). (d) Kinetic schemes and equilibrium constants for WT (*upper panel*) or super-active GluN1-E698C/GluN2B-L795C (*lower panels*) receptors. Records were analyzed at equilibrium. Ligand-binding steps are shown in gray. Note that for simplicity, long-lived desensitized steps are not shown. \* $P < 0.05$  relative to GluN1/GluN2A (two-tailed Student's *t*-test, unpaired). (e) Proposed mechanism for the conformational switch in full-length tetrameric GluN1/GluN2B receptor: inter-dimer rolling in the ABD layer is coupled to entry of the NTD layer in its active state. The positive allosteric modulator spermine, which binds the interface between GluN1 and GluN2B NTD lower lobes, enhances receptor activity by stabilizing the NTD compact form and therefore rolling. Conversely, the negative allosteric modulators zinc and ifenprodil inhibit receptor activity by stabilizing an expanded form of the NTDs (lower lobes further apart) thus preventing rolling. The rolling motion facilitates pore opening by acting on the ABD-TMD connecting linkers.



## **Supplementary Information**

### **An inter-dimer allosteric switch controls NMDA receptor activity**

Jean-Baptiste Esmenjaud, David Stroebel, Kelvin Chan, Teddy Grand, Mélissa David, Lonnie P. Wollmuth, Antoine Taly and Pierre Paoletti

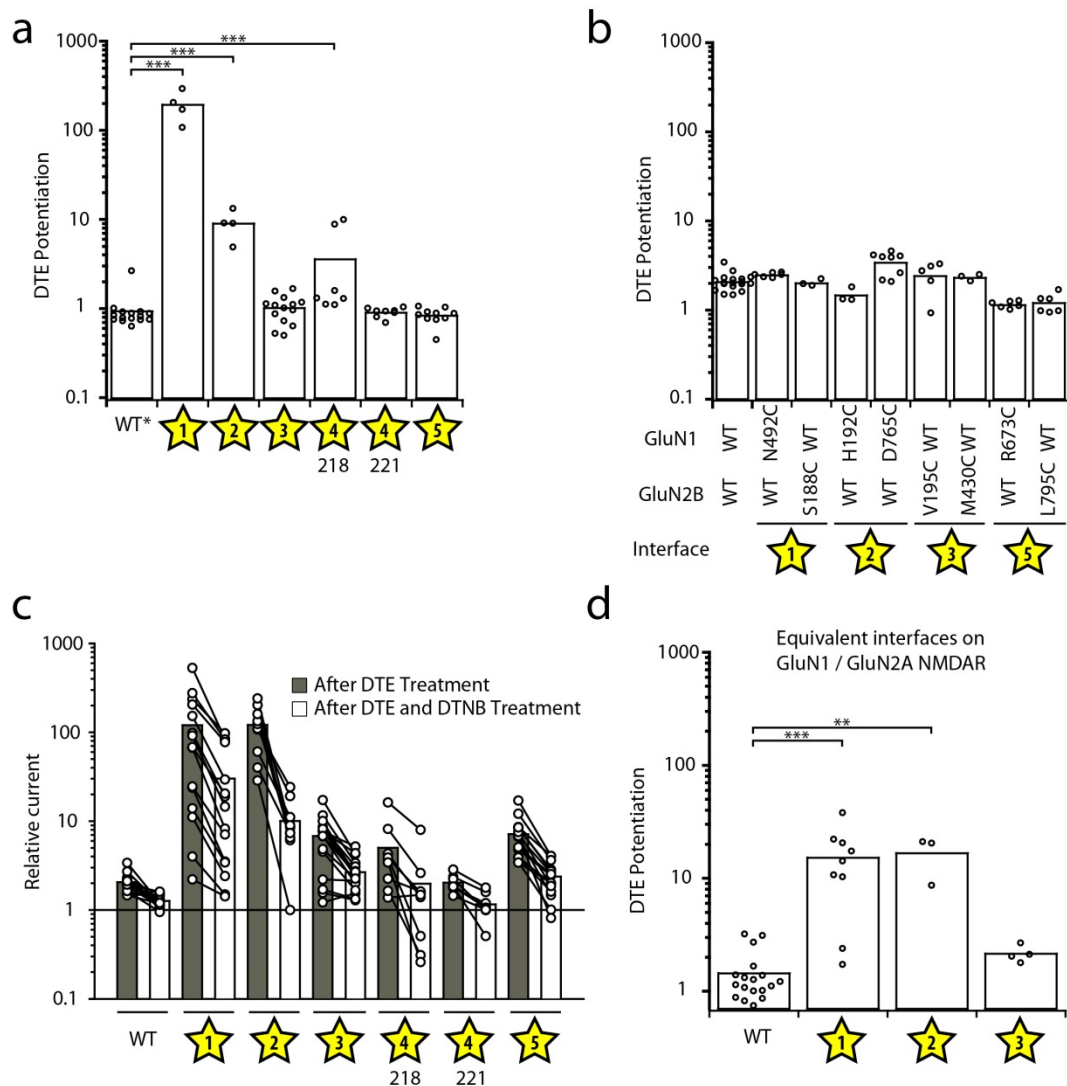
Corresponding authors: [pierre.paoletti@ens.fr](mailto:pierre.paoletti@ens.fr), [antoine.taly@ibpc.fr](mailto:antoine.taly@ibpc.fr)

#### **Supplementary information includes:**

Supplementary Figures 1-6

Supplementary Tables 1-5

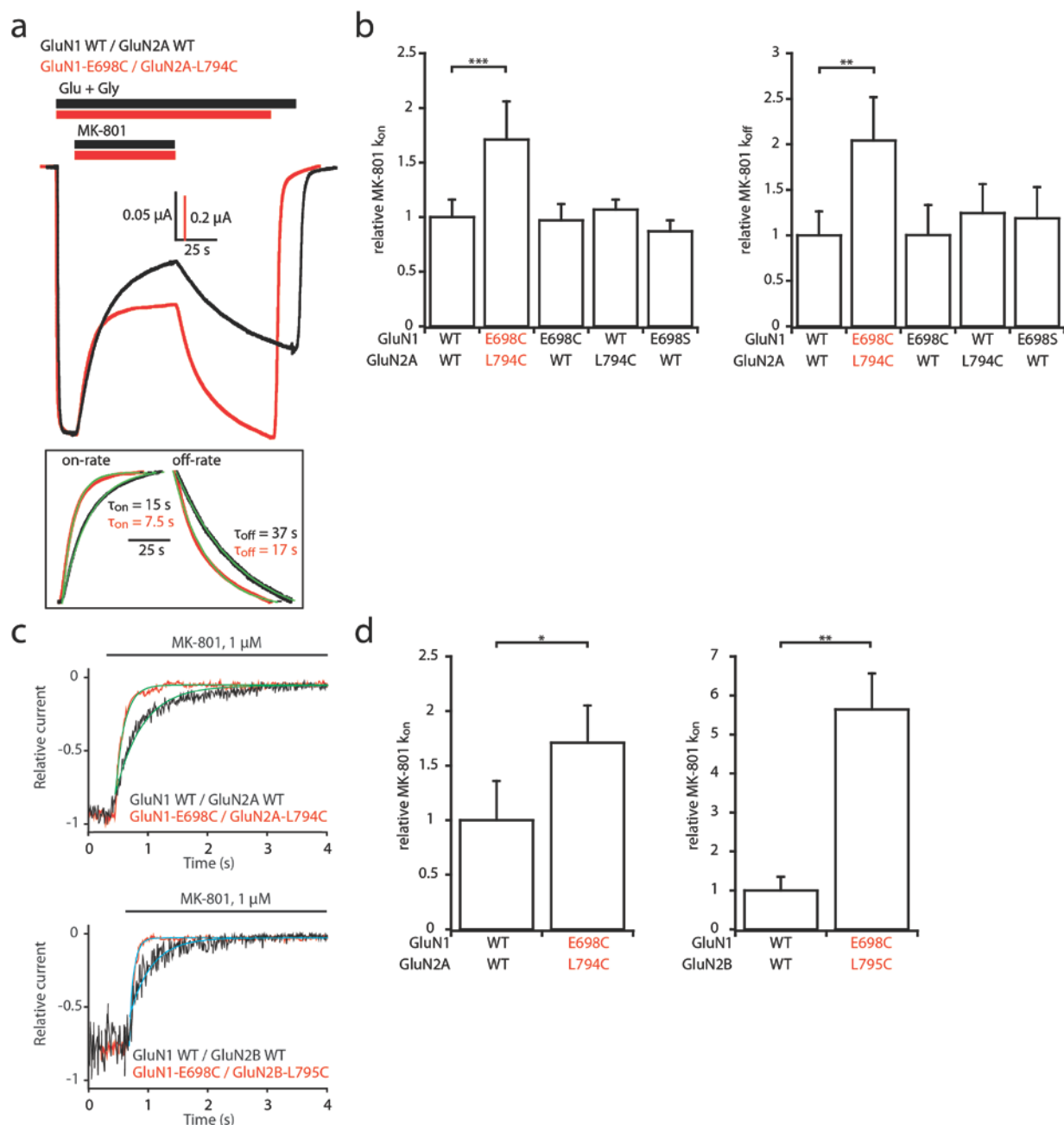
Supplementary Movie Legends 1-2



### Supplementary Figure 1: Effects of redox treatments on NMDAR activity.

(a) Summary of the DTE-induced potentiation of wild-type (WT) and double cysteine mutant receptors using the GluN1\* subunit as background. GluN1\* represents the GluN1 subunit with the two endogenous cysteines C744 and C798 mutated to alanine (C744A C798A). Because of the absence of the endogenous C744-C798 disulfide bridge, WT GluN1\*/GluN2B NMDARs are redox insensitive. Yellow stars and their numbers indicate different inter-domain and inter-layer interfaces as depicted in **Fig. 1a**. (b) Summary of the DTE-induced potentiation of wild-type (WT) and single-cysteine control mutants. (c) Change in current amplitude after reduction by DTE and subsequent oxidation by DTNB of WT and double cysteine mutant receptors. Changes are measured relative to initial current prior to DTE treatment. Solid lines are joining the two measures for each individual cell. (d) Summary of the DTE-induced potentiation of WT and double cysteine mutant GluN1/GluN2A NMDARs at interfaces 1, 2 and 3. Mutagenesis positions as well as mean and n values of all panels are given in **supplementary Table 1**. \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test.

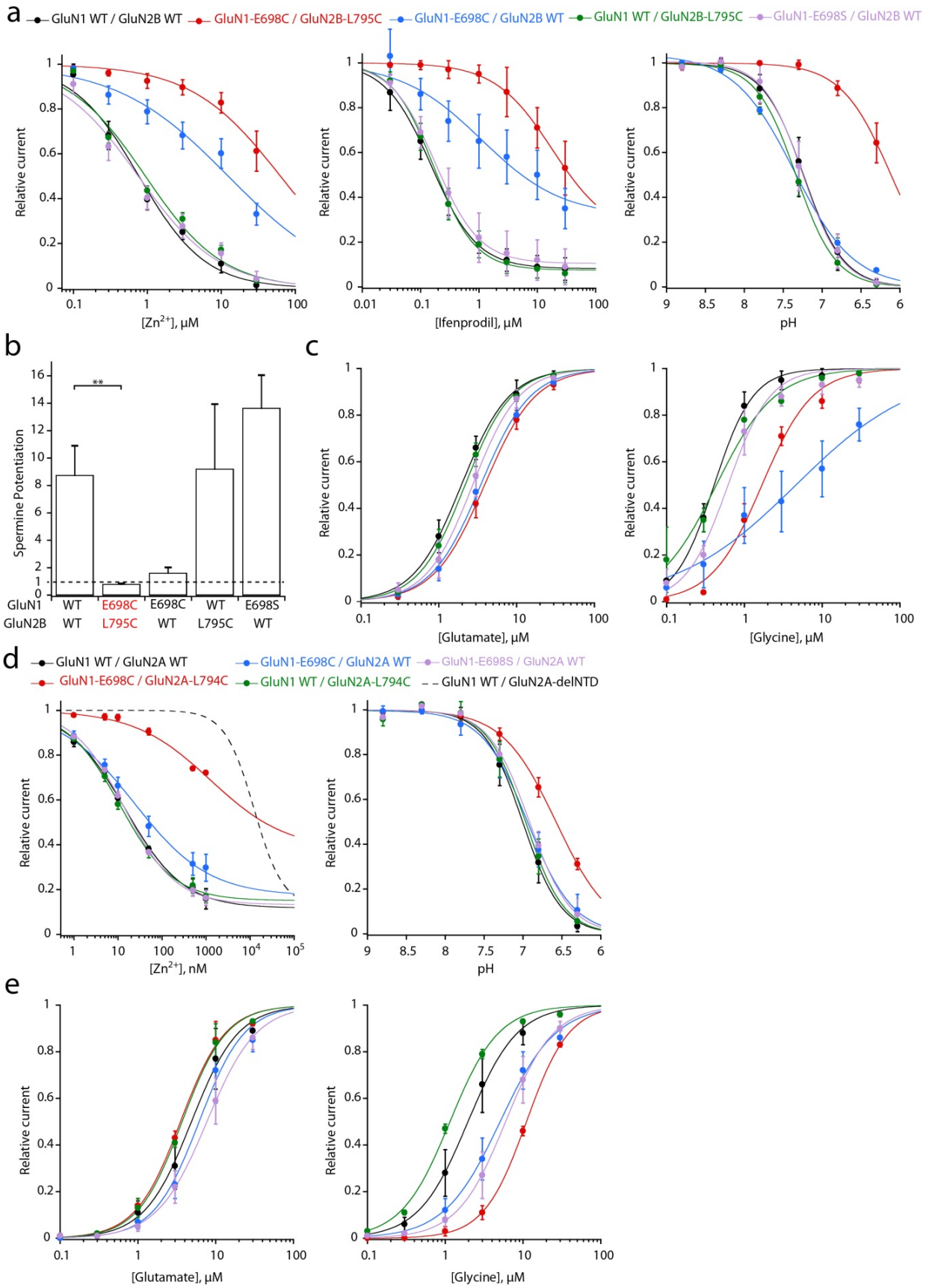




**Supplementary Figure 2: Trapping a rolling motion at the ABD inter-dimer interface results in super-activity both at GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors.**

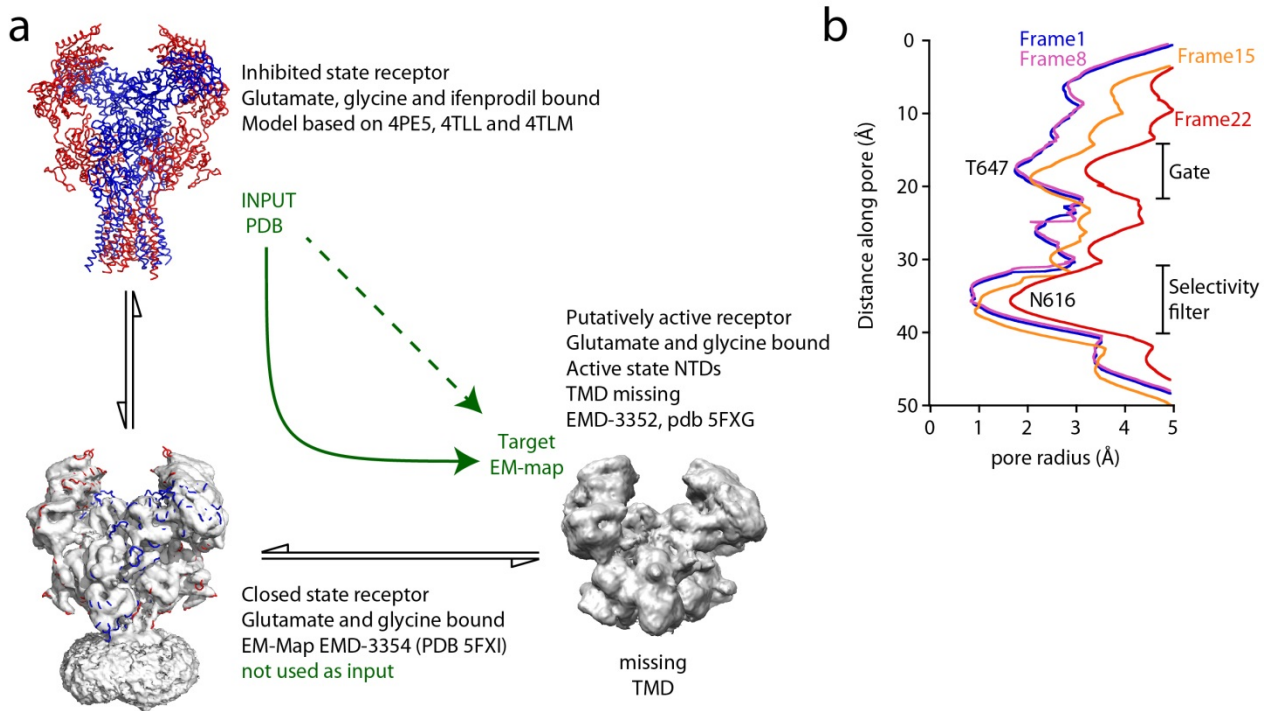
(a) Assessment of receptor channel activity using MK-801 inhibition kinetics in oocyte TEVC experiments. Representative current traces from oocytes expressing WT or the GluN1-E698C/GluN2A-L794C double mutant in response to 10 nM MK-801 during agonist application. Responses were scaled to the current amplitude obtained before MK-801 application. Inset, mono-exponential fits of MK-801 wash-in and wash-out. Note the strikingly faster kinetics in mutant receptors, both at the onset and offset of MK-801. (b) Relative MK-801 inhibition on- and off-rate constants ( $k_{on}$  and  $k_{off}$ ) obtained from experiments exemplified in panel b. (c) Assessment of receptor channel open probability in HEK293 whole-cell patch-clamp experiments using MK-801 inhibition kinetics. Representative current traces of 1  $\mu$ M

MK-801 inhibition of wild-type (WT) GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors, and the corresponding double cysteine mutant receptors GluN1-E698C/GluN2A-L794C and GluN1-E698C/GluN2B-L795C. Mono-exponential fits of MK-801 wash-in kinetics are shown in green. Responses were scaled to the current amplitude obtained before MK-801 application. **(d)** Relative MK-801 inhibition on-rate constants ( $k_{on}$ ) obtained from experiments exemplified in panel a. All values were normalized to the value obtained for the corresponding WT receptors. All values were normalized to the value obtained for WT GluN1/GluN2A receptors. Mean and n values of all panels are given in **Supplementary Table 2**, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P<0.001, one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD.



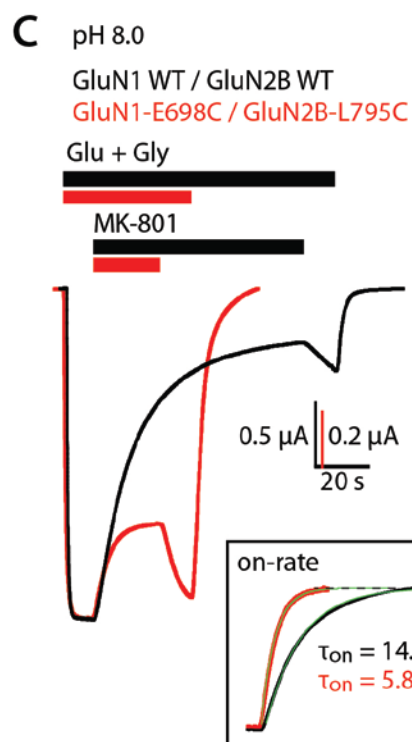
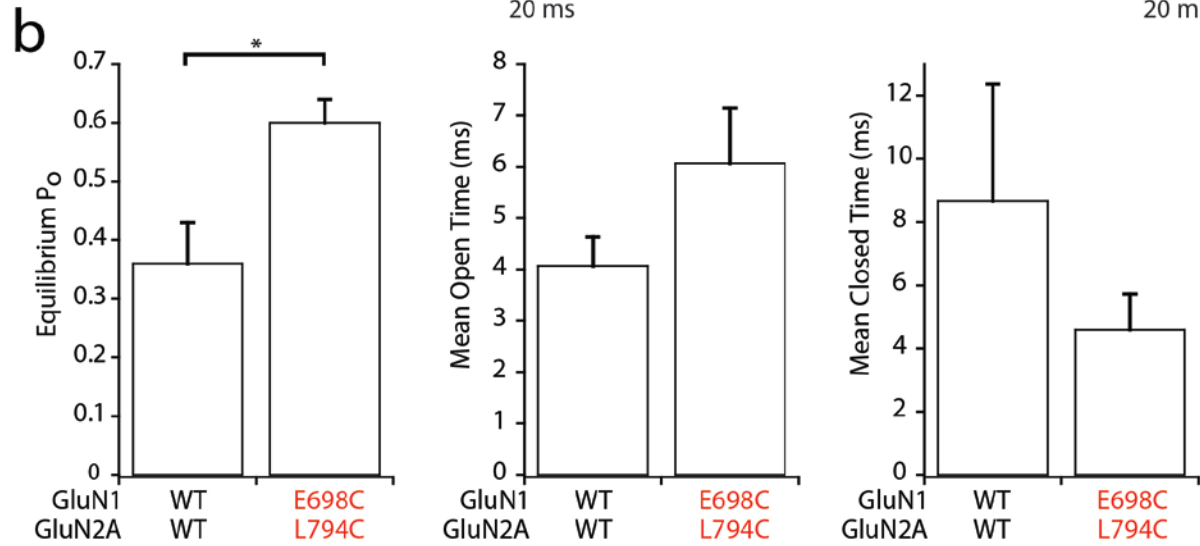
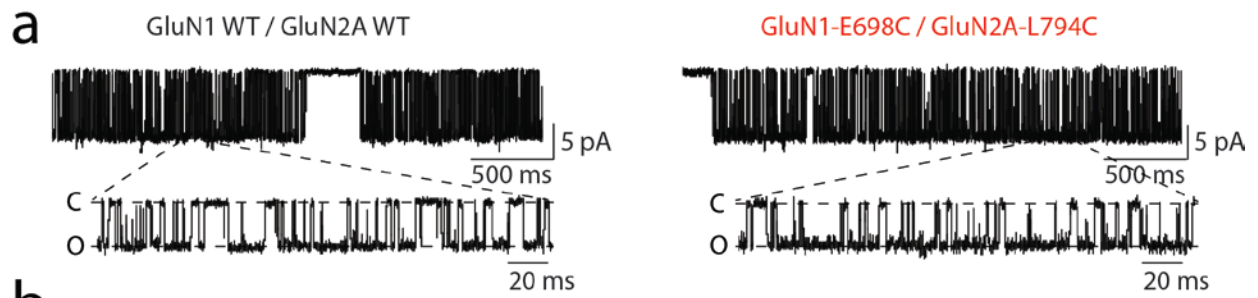
**Supplementary Figure 3: Super-active GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors are resistant to allosteric modulation.**

(a) Zinc, ifenprodil and pH dose-response curves of wild-type (WT) and single or double mutant GluN1/GluN2B receptors. (b) Spermine (200  $\mu$ M, pH 6.3) potentiation of WT GluN1/GluN2B and single or double mutant GluN1/GluN2B receptors. The first two columns are reproduced from **Fig. 3c**. (c) Glutamate and glycine dose-response curves of WT and single or double mutant GluN1/GluN2B receptors. (d) Zinc and pH dose-response curves of WT and mutant GluN1/GluN2A receptors. For comparison, the zinc dose-response curve of GluN1/GluN2A receptors lacking the whole GluN2A NTD (GluN1 WT/GluN2A-deINTD) is also shown (dashed lines; data from ref. 55). (e) Glutamate and glycine dose-response curves of WT and single or double mutant GluN1/GluN2A receptors. Values of  $IC_{50}$ , maximal inhibition (for zinc, ifenprodil and pH),  $EC_{50}$  (for glutamate and glycine), Hill coefficient (for all curves), mean (for spermine) and n are given in **Supplementary Table 3**.  $^{**}P < 0.01$ , one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD.

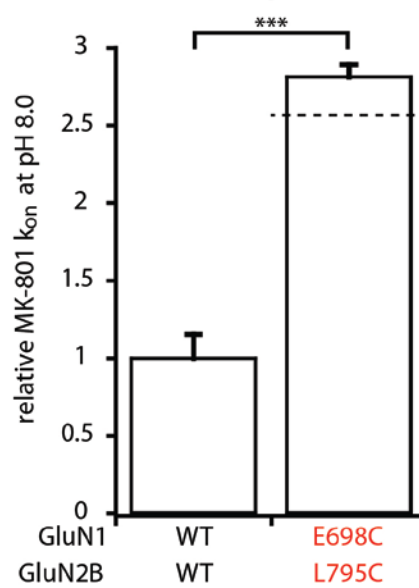


#### Supplementary Figure 4: Conformational transitions associated to rolling.

(a) Diagram representing the iMODfit input (inhibited state; top left) for the fitting presented in **Fig. 4**, the 8<sup>th</sup> frame of the trajectory (bottom left, line representation) inside the EM-Map EMD-3354 (closed state; envelope representation) and the target structure (putative active state, bottom right; envelope representation, TMD not resolved). The good overlap between the 8<sup>th</sup> frame and the EM-Map 3354 reveals that the iMODFit trajectory passes by this experimentally determined structural state, even though EM-Map 3354 was not fed in the simulation. (b) Pore radius calculated using HOLE (Smart et al., 1993) at different steps of the iMODFit fitting presented on **Fig. 4**: initial model frame 1 in blue, frame 8 (after step 1) in pink, frame 15 (after step 2) in orange and frame 22 (final frame) in red. Note the large dilation in the upper half of the pore (gate region comprising the M3 SYTANLAAF motif) when transiting through the frames.

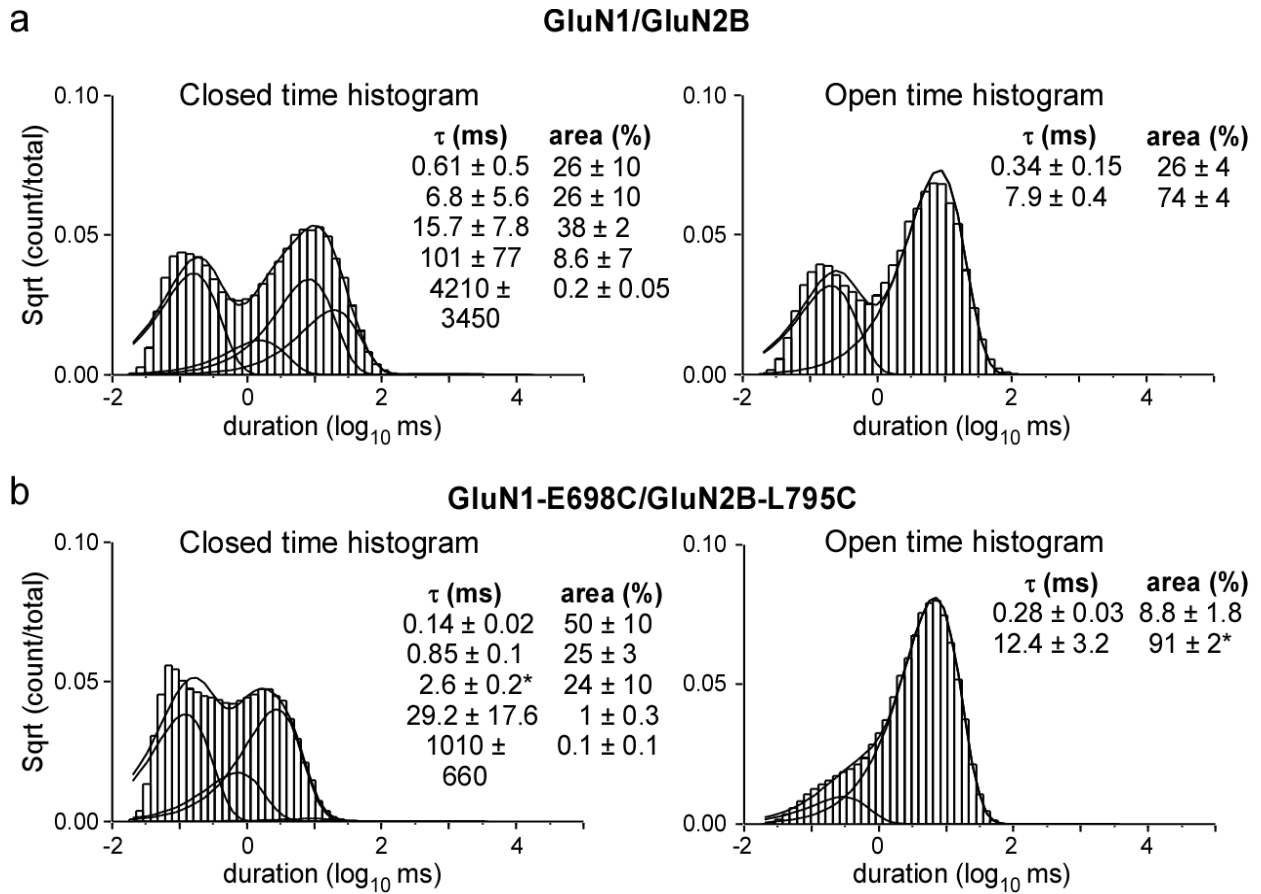


**d** --- Observed in single channel experiments, pH 8.0



**Supplementary Figure 5: Super-active receptors at the population and single molecule level.**

(a) Representative recordings of patches containing one single wild-type (WT) or GluN1-E698C/GluN2A-L794C receptor. The bottom trace is an expanded view. C, closed channel; O, open channel. (b) Single channel properties (equilibrium channel open probability, mean open time, mean closed time) of the WT and super-active GluN1-E698C/GluN2A-L794C receptors. Mean and n values are given in **Supplementary Table 4** \* $P < 0.05$ , two-tailed Student's t-test, unpaired. Error bars, SEM. (c) Representative current traces from oocytes expressing either WT or the GluN1-E698C/GluN2B-L795C double mutant receptor in response to 30 nM MK-801 during agonist application at pH 8.0. Responses were scaled to the current amplitude obtained before MK-801 application. Inset, mono-exponential fits of MK-801 wash-in. Note the strikingly faster kinetics in mutant receptors. (d) Relative MK-801 inhibition on-rate constants ( $k_{on}$ ) obtained from experiments exemplified in panel c. All values were normalized to the value obtained for WT GluN1/GluN2B receptors at pH 8.0. The change in channel open probability ( $P_o$ ) measured in single-channel experiments performed at the same pH is shown for comparison (dashed line). Mean and n values are given in **Supplementary Table 2**, \*\*\* $P < 0.001$ , one-way ANOVA on ranks followed by Bonferroni corrected Dunn's test. Error bars, SD.



**Supplementary Figure 6: Equilibrium open and closed time distributions for WT and super-active receptors.**

Closed (*left*) and open (*right*) durations for GluN1/GluN2B WT (**a**) and GluN1-E698C/GluN2B-L795C receptors (**b**). For all constructs, the closed-time distributions were best fit by five exponentials and the open time distribution by 2 exponentials. *Insets*, mean values ( $\pm$  SEM) for closed and open state durations (*left*,  $\tau$ , ms) and occupancies (*right*,  $\alpha$ , %).



**Supplementary Table 1: Summary of redox treatment effect on NMDAR current amplitude.**

Interface	Receptor	DTE Potentiation	n	DTNB reversion	Reversibility
<b>GluN1/GluN2B receptors: double cysteine mutants</b>					
WT	GluN1 WT / GluN2B WT	2.06 ± 0.46	18	1.26 ± 0.18	0.75
1	GluN1-N492C / GluN2B-S188C	120.35 ± 144.15	15	30.20 ± 35.63	0.76
2	GluN1-H162C-D765C / GluN2B WT	121.03 ± 68.20	10	10.02 ± 6.77	0.93
3	GluN1 WT / GluN2B-V195C-M430C	7.15 ± 3.95	16	2.74 ± 1.10	0.72
4	GluN1 WT / GluN2B-N218C	5.47 ± 4.76	8	2.03 ± 2.53	0.70
4	GluN1 WT / GluN2B-K221C	2.03 ± 0.44	8	1.15 ± 0.39	0.85
5	GluN1-R673C / GluN2B-L795C	9.32 ± 5.49	15	2.38 ± 0.99	0.78
<b>GluN1/GluN2B receptor: single cysteine mutants</b>					
1	GluN1-N492C / GluN2B WT	2.46 ± 0.14	6		
1	GluN1 WT / GluN2B-S188C	2.00 ± 0.18	3		
2	GluN1-H162C / GluN2B WT	1.46 ± 0.28	3		
2	GluN1-D765C / GluN2B WT	3.39 ± 0.96	8		
3	GluN1 WT / GluN2B-V195C	2.41 ± 0.94	5		
3	GluN1 WT / GluN2B-M430C	2.30 ± 0.19	3		
5	GluN1-R673C / GluN2B WT	1.14 ± 0.10	6		
5	GluN1 WT / GluN2B-L795C	1.19 ± 0.29	6		
<b>GluN1*/GluN2B receptor (GluN1-C744A-C798A background)</b>					
WT*	GluN1* / GluN2B WT	0.94 ± 0.49	15		
1	GluN1*-N492C / GluN2B-S188C	195.76 ± 78.13	4		
2	GluN1*-H162C-D765C / GluN2B WT	9.12 ± 3.43	4		
3	GluN1* / GluN2B-V195C-M430C	1.03 ± 0.36	14		
4	GluN1* / GluN2B-N218C	3.62 ± 4.00	7		
4	GluN1* / GluN2B-K221C	0.91 ± 0.11	8		
5	GluN1*-R673C / GluN2B-L795C	0.84 ± 0.17	10		
<b>GluN1/GluN2A receptors: double cysteine mutants</b>					
WT	GluN1 WT / GluN2A WT	1.43 ± 0.76	18		
1	GluN1-N489C / GluN2A-T189C	15.21 ± 11.08	9		
2	GluN1-H162C-D765C / GluN2B WT	16.66 ± 6.96	3		
3	GluN1 WT / GluN2B-V196C-T426C	2.14 ± 0.37	4		

Values shown are mean ± SD.

**Supplementary Table 2: Summary of MK-801 inhibition kinetics experiments.**

Receptor	Oocytes TEVC experiments				HEK293 cells patch-clamp experiments	
	Relative $k_{on}$	n	Relative $k_{off}$	n	Relative $k_{on}$	n
<b>GluN1/GluN2B receptors, interface 5</b>						
GluN1 WT / GluN2B WT	1 ± 0.14	22	1 ± 0.13	19	1 ± 0.33	5
GluN1-E698C / GluN2B-L795C	5.38 ± 1.23	24	7.89 ± 2.09	23	5.64 ± 0.93	6
GluN1-E698C / GluN2B WT	1.39 ± 0.49	8	0.82 ± 0.35	6		
GluN1 WT / GluN2B-L795C	1.56 ± 0.52	8	0.92 ± 0.23	5		
GluN1-E698S / GluN2B WT	1.33 ± 0.30	5	1.13 ± 0.31	5		
<b>GluN1/GluN2A receptors, interface 5</b>						
GluN1 WT / GluN2A WT	1 ± 0.16	25	1 ± 0.26	7	1 ± 0.36	5
GluN1-E698C / GluN2A-L794C	1.71 ± 0.35	20	2.04 ± 0.47	6	1.71 ± 0.34	5
GluN1-E698C / GluN2A WT	0.97 ± 0.15	25	1.00 ± 0.33	6		
GluN1 WT / GluN2A-L794C	1.07 ± 0.09	17	1.24 ± 0.32	6		
GluN1-E698S / GluN2A WT	0.87 ± 0.10	6	1.18 ± 0.34	6		
<b>GluN1/GluN2B receptors, interface 1</b>						
GluN1 WT / GluN2B WT	1.00 ± 0.16	7				
GluN1-N495C / GluN2B-N192C	2.10 ± 0.24	7				
GluN1-N495C / GluN2B WT	1.14 ± 0.01	5				
GluN1 WT / GluN2B-N192C	0.58 ± 0.06	5				
<b>GluN1/GluN2B receptors, interface 5, pH 8.0</b>						
GluN1 WT / GluN2B WT	1 ± 0.15	9				
GluN1-E698C / GluN2B-L795C	2.81 ± 0.08	6				

Values shown are mean ± SD.

Supplementary Table 3: Summary of pharmacology experiments.

		Zn <sup>2+</sup>			Ifenprodil			pH				
Receptor subtype	IC <sub>50</sub>	I <sub>max</sub>	n <sub>Hill</sub>	n	IC <sub>50</sub>	I <sub>max</sub>	n <sub>Hill</sub>	n	pH <sub>50</sub>	I <sub>max</sub>	n <sub>Hill</sub>	n
<b>Glun1/Glun2B, interface 5</b>												
Glun1 WT / Glun2B WT	0.77 ± 0.11	fixed to 1	0.97 ± 0.12	4	0.15 ± 0.00	0.92 ± 0.00	1.10 ± 0.02	12	7.24 ± 0.02	1.00 ± 0.01	1.68 ± 0.09	8
Glun1-E698C / Glun2B-L795C	63.07 ± 14.28	fixed to 1	0.72 ± 0.01	5	18.1 ± 4.92	0.77 ± 0.09	0.87 ± 0.06	9	6.11 ± 0.03	1.00 ± 0.01	1.36 ± 0.16	6
Glun1-E698C / Glun2B WT	12.43 ± 2.74	fixed to 1	0.57 ± 0.08	5	1.10 ± 1.05	0.68 ± 0.15	0.63 ± 0.24	14	7.36 ± 0.02	1.04 ± 0.02	1.13 ± 0.06	4
Glun1 WT / Glun2B-L795C	0.94 ± 0.19	fixed to 1	0.83 ± 0.13	5	0.17 ± 0.01	0.92 ± 0.01	1.22 ± 0.08	10	7.34 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.69 ± 0.08	4
Glun1-E698S / Glun2B WT	0.75 ± 0.13	fixed to 1	0.80 ± 0.10	5	0.18 ± 0.01	0.89 ± 0.01	1.14 ± 0.05	7	7.25 ± 0.02	1.01 ± 0.02	1.71 ± 0.13	7
<b>Glun1/Glun2A, interface 5</b>												
Glun1 WT / Glun2A WT	14.65 ± 2.12 <sup>#</sup>	0.88 ± 0.03	0.66 ± 0.05	4					7.00 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.75 ± 0.18	5
Glun1-E698C / Glun2A-L794C	1256.3 ± 4646.5 <sup>#</sup>	0.62 ± 0.62	0.5 ± 0.19	4					6.58 ± 0.01	1.00 ± 0.00	1.26 ± 0.03	7
Glun1-E698C / Glun2A WT	23.41 ± 10.38 <sup>#</sup>	0.83 ± 0.07	0.51 ± 0.08	4					6.94 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.48 ± 0.05	5
Glun1 WT / Glun2A-L794C	11.17 ± 1.11 <sup>#</sup>	0.85 ± 0.02	0.72 ± 0.05	4					6.97 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.75 ± 0.19	5
Glun1-E698S / Glun2A WT	13.821 ± 1.00 <sup>#</sup>	0.86 ± 0.01	0.74 ± 0.04	4					6.92 ± 0.03	1.00 ± 0.02	1.65 ± 0.15	5
<b>Receptor subtype</b>												
	<b>Spermine</b>			<b>Glutamate</b>			<b>Glycine</b>					
	Mean	n	EC <sub>50</sub>	n <sub>Hill</sub>	n	EC <sub>50</sub>	n <sub>Hill</sub>	n				
<b>Glun1/Glun2B, interface 5</b>												
Glun1 WT / Glun2B WT	8.73 ± 2.17	10	1.95 ± 0.07	1.41 ± 0.07	8	0.41 ± 0.02	1.73 ± 0.11	7				
Glun1-E698C / Glun2B-L795C	0.78 ± 0.07	9	3.87 ± 0.08	1.33 ± 0.03	6	1.68 ± 0.17	1.33 ± 0.16	4				
Glun1-E698C / Glun2B WT	1.60 ± 0.43	7	3.45 ± 0.13	1.36 ± 0.06	7	4.58 ± 0.84	0.56 ± 0.07	7				
Glun1 WT / Glun2B-L795C	9.19 ± 4.74	6	2.17 ± 0.08	1.45 ± 0.07	5	0.44 ± 0.05	1.15 ± 0.14	5				
Glun1-E698S / Glun2B WT	13.62 ± 2.42	8	2.72 ± 0.06	1.45 ± 0.04	6	0.62 ± 0.07	1.61 ± 0.25	5				
<b>Glun1/Glun2A, interface 5</b>												
Glun1 WT / Glun2A WT	4.87 ± 0.33	9	1.44 ± 0.12	1.50 ± 0.11	5	11.06 ± 0.11	1.58 ± 0.02	5				
Glun1-E698C / Glun2A-L794C	3.52 ± 0.19	5	1.50 ± 0.11	1.49 ± 0.17	8	5.07 ± 0.28	1.21 ± 0.07	7				
Glun1-E698C / Glun2A WT	6.12 ± 0.56	8	1.49 ± 0.17	1.52 ± 0.09	6	1.15 ± 0.06	1.39 ± 0.09	6				
Glun1 WT / Glun2A-L794C	3.69 ± 0.16	6	1.52 ± 0.09	1.36 ± 0.02	7	5.96 ± 0.10	1.40 ± 0.03	5				
Glun1-E698S / Glun2A WT	7.70 ± 0.11	7	1.36 ± 0.02									

All IC<sub>50</sub> and EC<sub>50</sub> values are given in μM except for those marked with <sup>#</sup> which are given in nM.

**Supplementary Table 4: Single channel properties of wild type and ABD rolling locked GluN2A- and GluN2B- containing NMDA receptors.**

Construct	Total events (# of patches)	<i>i</i> <i>pA</i>	eq. $P_{open}$	MCT <i>ms</i>	MOT <i>ms</i>
GluN1/GluN2A	511004 (7)	-7.6 ± 0.4	0.36 ± 0.07	8.7 ± 3.7	4.1 ± 0.6
GluN1-E698C/ GluN2A-L794C	295171 (8)	-8.3 ± 0.5	0.60 ± 0.04*	4.6 ± 11.2	6.1 ± 1.1
GluN1/GluN2B	205064 (5)	-7.6 ± 0.3	0.29 ± 0.05	15.8 ± 2.1	6.4 ± 1.3
GluN1-E698C/ GluN2B-L795C	286299 (5)	-6.5 ± 0.3*	0.74 ± 0.07*	5.1 ± 1.9*	14.2 ± 2.4*

Values shown are mean ± SEM for single-channel current amplitude (*i*), equilibrium open probability ( $P_o$ ), mean closed time (MCT), and mean open time (MOT). Single channel currents were recorded in the on-cell mode at approximately -100 mV and analyzed in QuB (see Online Methods). Number of patches is in parenthesis to the right of total events. Eq  $P_o$  is the fractional occupancy of the open states in the entire single-channel recording, including long lived closed states (desensitized states). All data were idealized and fit at a dead time of 20  $\mu$ s.

Asterisks (\*) indicate values significantly different than their respective wild type ( $p \leq 0.05$ , two-tailed Student's *t*-test, unpaired).

**Supplementary Table 5: Cross-link ABD rolling alters activation kinetic rate constants.**

		C <sub>3</sub> -C <sub>2</sub>	C <sub>2</sub> -C <sub>1</sub>	C <sub>1</sub> -O <sub>1</sub>	C <sub>3</sub> -C <sub>5</sub>	C <sub>2</sub> -C <sub>4</sub>	O <sub>1</sub> -O <sub>2</sub>
<b>GluN1/</b>	k <sub>f</sub>	230±100	530±180	1670±770	40±20	1.2±0.2	2640±930
<b>GluN2B</b>	k <sub>r</sub>	230±120	2430±1100	1220±370	11.9±7.8	0.6±0.2	430±60
	K <sub>eq</sub>	3.3±2.2	0.33±0.12	1.2±0.5	3.6±1.3	3.5±1.7	5.8±1.7
	ΔG	-0.40±0.4	0.75±0.24	0.09±0.37	-0.67±0.22	-0.59±0.30	-0.96±0.23
<b>GluN1- E698C</b>	k <sub>f</sub>	610±150	1320±120	4130±460	71±31	3.4±2.4	2420±190
	k <sub>r</sub>	240±76	2550±840*	450±90	23±5	4.5±3.6	840±200
<b>GluN2B-</b>	K <sub>eq</sub>	2.6±0.2	0.60±0.15	9.7±1.4*	3.6±2.1	3.7±1.9	3.2±0.8
<b>L795C</b>	ΔG	-0.57±0.05	0.34±0.15	-1.3±0.1*	-0.52±0.39	-0.03±0.98	-0.66±0.14

Mean values ( $\pm$  SEM) for forward (k<sub>f</sub>) and reverse (k<sub>r</sub>) kinetic rate constants (s<sup>-1</sup>) for a 5C-2O kinetic scheme (Fig. 6). ΔG is in units of kcal/mol. Kinetics models were constructed as C<sub>3</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-O<sub>2</sub> while C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> branched from C<sub>3</sub> and C<sub>2</sub>, respectively (see Online Methods). C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> reflect desensitized states.



**Supplementary movie 1: An inter-dimer ABD rolling motion mediates inter-layer coupling and facilitates pore opening during NMDAR transition from the inhibited to the active state.**

The GluN2B subunits are shown in blue and the GluN1 subunits in red. The transition is first shown from two orthogonal lateral views of the full-length receptor. Then, motions within each layer are shown from the extracellular space, in the following order: NTD, ABD, TMD.

For each view, the transition is shown one time entirely and a second time with a sequential decomposition in three steps (see **Fig. 4**): Step 1 involves NTD motions, Step 2 associates ABD rolling and NTD dimer reorganization, and Step 3 corresponds to the rearrangement of the transmembrane domain in the direction of pore opening.



### **Supplementary movie 2: ABD rolling mechanism and inter-layer coupling**

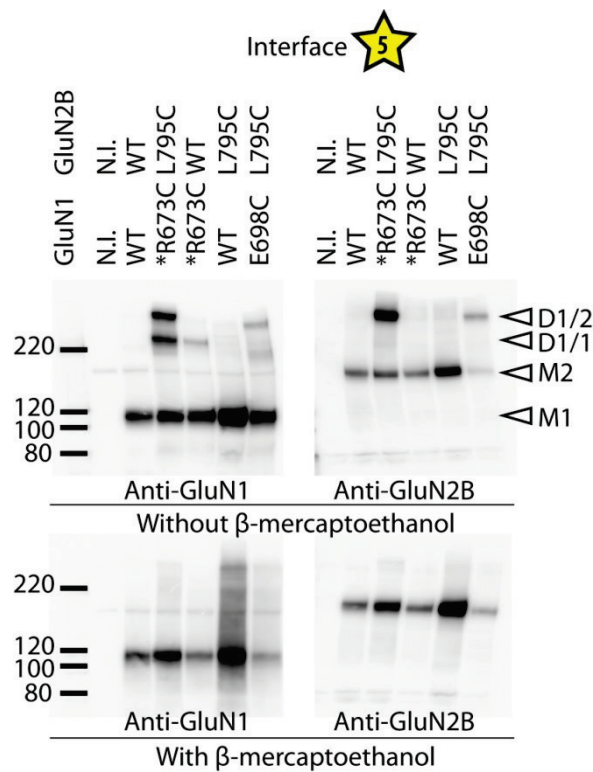
The GluN2B subunits are shown in blue and the GluN1 subunits in red. NTDs are highlighted in cyan (for GluN2B) and orange (for GluN1). For clarity, only two subunits are shown. After a global view, focus is made on the ABD inter-dimer interface and the protruding GluN1 ABD 'loop 2'. For each view, the transition is shown one time entirely and a second time with a sequential decomposition in three steps (see above and **Fig. 4**). Residues used for mutagenesis (see **Fig. 2**) are shown as green spheres becoming white when occupying positions in sufficient proximity for disulfide bonding. The GluN1 ABD 'loop 2' is highlighted as yellow spheres. Note the downward motion of the loop in step 2.

### 2.3.3. Résultats non intégrés à l'article

Le dépontage par traitement au DTE de l'interface 5 piégée dans sa conformation inactive aux positions GluN1-R673C/GluN2B-L795C aboutit à une potentiation de près d'un facteur 10, contre un facteur 2 environ pour le récepteur sauvage (Figure 1 et table supplémentaire 1 de l'article). Cet effet du traitement réducteur, supérieur au simple effet endogène démontre que nous avons capturé le récepteur dans une conformation inhibée à laquelle la rupture de la liaison covalente entre les deux cystéines met fin.

Cependant pour cette position, les tests effectués dans le contexte de récepteurs insensibles au traitement réducteur (utilisation de « GluN1\* », portant la mutation GluN1-C744A-C798A au niveau du pont endogène contrôlant la sensibilité au potentiel d'oxydo-réduction, voir 1.4.3) ne révèlent pas de différence entre les mutants GluN1\*-R673C/GluN2B-L795C et les récepteurs « sauvages » GluN1\*/GluN2B wt. Aucun des deux n'est potentié par le traitement au DTE (Figure supplémentaire 1a et table supplémentaire 1 de l'article). Une des explications pour expliquer la différence d'effet entre les deux séries d'expériences est un arrangement différent qui empêche l'établissement de notre pont artificiel quand le pont endogène est absent. Nous avons donc voulu vérifier biochimiquement que le passage en contexte GluN1\* n'empêchait pas la formation du pont disulfure introduit dans l'interface 5. La Figure 2.3-3 montre que le pont disulfure est bien présent même en contexte GluN1\* car l'hétérodimère est détecté. Il semble donc que dans ce contexte, le pont se forme bel et bien mais ne piège pas le récepteur dans une conformation inactive.

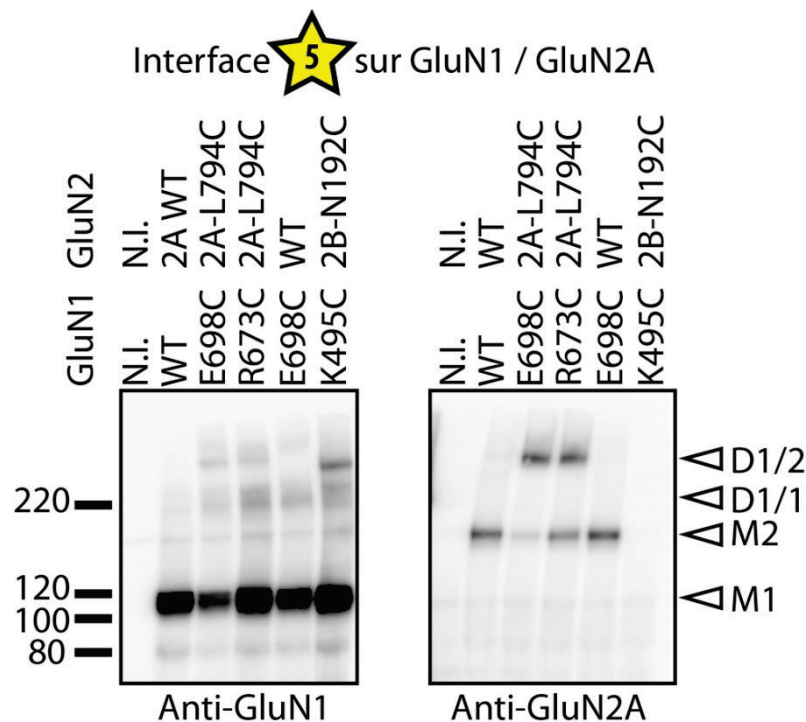




**Figure 2.3-3 : Détection du pont disulfure introduit à l'interface 5 pour piéger la conformation inactive chez les récepteurs GluN1/GluN2B.**

Immunodétection de récepteurs NMDA mutants ou sauvages exprimés en ovocytes de Xénope. M1 indique le monomère GluN1 (~110 kDa), M2 indique le monomère GluN2B (~180 kDa); D1/1 l'homodimère GluN1 (~220 kDa); et D1/2 l'hétérodimère GluN1/GluN2B (~290 kDa). En bas, la même expérience a été réalisée en conditions réductrices par l'ajout de  $\beta$ -mercaptoethanol. La condition GluN1-E698C/GluN2B-L795C est un contrôle positif. N.I. : ovocytes non injectés.

Chez les récepteurs GluN1/GluN2A, il est également possible de piéger les récepteurs en conformation super-active au niveau de l'interface 5 (Figure supplémentaire 2 de l'article) en utilisant les positions de mutagenèse homologues à celles trouvées chez GluN1/GluN2B. Nous avons voulu vérifier biochimiquement la présence du pont disulfure introduit. La position équivalente à GluN1-R673C/GluN2B-L795C qui piège en position inactive (Figure 1 de l'article) a également été testée par western blot. La détection d'hétérodimères (Figure 2.3-4) montre que les ponts disulfures sont effectivement présents.



**Figure 2.3-4 : Détection des ponts disulfures introduits à l'interface 5 pour piéger différentes conformations chez les récepteurs GluN1/GluN2A.**

Immunodétection de récepteurs NMDA mutants ou sauvages exprimés en ovocytes de Xénope. M1 indique le monomère GluN1 (~110 kDa), M2 indique le monomère GluN2A ou GluN2B (~180 kDa); D1/1 l'homodimère GluN1 (~220 kDa); D1/2 l'hétérodimère GluN1/GluN2A ou GluN1/GluN2B (~290 kDa). La condition GluN1-K495C/GluN2B-N192C est un contrôle positif non détecté par l'anticorps spécifique de GluN2A utilisé (Ab A12W, dilution 1:500) ; N.I. : ovocytes non injectés.

### 2.3.4. Discussion

Le mécanisme allostérique que nous proposons permet de coupler les mouvements des domaines modulateurs N-terminaux à la machinerie d'activation en aval. Il est également impliqué dans l'activation du récepteur, comme en témoigne la possibilité d'obtenir des récepteurs NMDA « super-actifs » et le très fort déplacement vers l'ouverture de l'équilibre  $C_1-O_1$  dans le modèle cinétique d'activation. Nos expériences confirment donc l'hypothèse selon laquelle la carte de densité électronique EMD-3352 dont le domaine transmembranaire n'est pas résolu représente la partie extracellulaire

d'un récepteur actif (Tajima et al. 2016). Elles démontrent par ailleurs l'importance de l'interface entre dimères d'ABD dans l'activation et la modulation des récepteurs NMDA.

La majorité de nos expériences ayant été réalisées sur GluN1/GluN2B, on peut se demander dans quelle mesure ce modèle est transposable aux autres sous-types de récepteurs NMDA. Nos expériences montrant que la mobilité aux interfaces NTDs-ABDs est essentielle lors de l'activation ont été transposées aux récepteurs GluN1/GluN2A (Figure supplémentaire 1 de l'article), mais ces résultats n'impliquent pas que le mécanisme qui lie les deux couches est le même chez ces deux sous-types car le pontage entre couches pourrait impacter des mouvements dissemblables dans les deux cas.

Au niveau de la couche ABD, en bloquant le rolling chez GluN1/GluN2A, nous avons pu également obtenir un récepteur NMDA « super-actif » et largement insensible à l'inhibition allostérique par les protons ou le zinc (Figure supplémentaire 2 et 5 de l'article). Nous avons par ailleurs vérifié que les ponts disulfures sont bien détectables chez ce sous-type de récepteur aussi (Figure 2.3-4). L'augmentation de la probabilité d'ouverture lorsque l'on piège la rotation des dimères d'ABD suggère que ce mouvement existe également chez GluN1/GluN2A. La plus forte probabilité d'ouverture basale chez ce sous-type ( $P_{o,max}$  0.5 vs 0.1 pour GluN1/GluN2 ; Erreger et al. 2005) pourrait s'expliquer par un récepteur déjà partiellement « rollé », il resterait alors une moins grande amplitude de mouvement pour la potentiation. Cette hypothèse est cohérente avec les données montrant un contrôle de la  $P_o$  du récepteur NMDA par le NTD de la sous-unité GluN2 (voir Figure 1.4-7 page 72 ; (Gielen et al. 2009, Yuan et al. 2009)) si l'on considère que l'état partiellement rollé découle d'un dimère NTD GluN1/GluN2A en conformation plus compacte que chez GluN1/GluN2B.

Néanmoins, chez les récepteurs GluN1/GluN2A, certaines données indiquent une implication de l'interface intra-dimère des ABDs dans la modulation allostérique. Cette interface est connue pour se rompre en partie lors de la désensibilisation des récepteurs AMPA (Figure 1.3-6 et Figure 1.3-7), et le cyclothiazide qui agit comme une colle moléculaire à cet endroit empêche cette désensibilisation (Sun et al. 2002). Hors, il a été montré que la déstabilisation de cette interface chez les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A conduit à une sensibilité zinc augmentée ( $I'IC_{50}$  du récepteur sauvage,

10 nM, diminue d'un facteur 10) et supprime le plateau d'inhibition. En concentration saturante de zinc, 60 à 80 % du courant est inhibé chez les récepteurs sauvages contre une inhibition presque totale chez les récepteurs dont l'interface est affaiblie (Gielen et al. 2008). On observe par ailleurs une augmentation de la sensibilité au pH des récepteurs mutés. À l'inverse, un blocage des réarrangements structuraux au même endroit par insertion d'un pont disulfure diminue fortement la sensibilité au zinc. En accord avec ces résultats, les modulateurs allostériques ciblant la couche ABD des récepteurs NMDA GluN1/GluN2A se lient au niveau de l'interface intra-dimère ABD. Ils permettent d'inhiber l'activité du récepteur pour les composés du type TCN-201 (Bettini et al. 2010, Hansen et al. 2012), par un effet non compétitif de diminution de la liaison de la glycine sur GluN1, ou d'augmenter l'activité du récepteur pour les composés du type 'GNE', par une action sur l'efficacité et/ou l'affinité pour le glutamate (voir 1.4.6 ; Hackos et al. 2016). GNE-6901 et GNE-8224 ont un effet de type 2 montrant qu'il est possible d'augmenter la réponse à une concentration saturante de glutamate au niveau de cette interface. GNE-8324 a également un effet de type 1 d'augmentation de l'affinité apparente de GluN2A (Hackos and Hanson 2017). Ces faisceaux d'indices suggèrent l'existence d'un mécanisme de régulation allostérique bidirectionnel au niveau de l'interface intra-dimère ABD chez les récepteurs GluN1/GluN2A, mais même si des structures du dimère isolé, lié ou non aux modulateurs, existent, elles ne permettent pas de faire des hypothèses aisément. Il serait intéressant de vérifier si notre mutant super-actif est insensible aux modulateurs allostériques qui ciblent cette interface comme il l'est pour le zinc. Cette expérience et d'autres, pourraient expliciter comment cette autre régulation allostérique de la couche ABD s'articule avec le 'rolling'.

Le mécanisme allostérique que nous avons mis en évidence couple les domaines NTDs distaux et le domaine transmembranaire à environ 10 nm de distance ce qui est considérable : cela correspond grossièrement à 70 fois la taille d'une liaison simple entre deux atomes de carbones. Pourtant, ce sont les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> qui détiennent le record d'interaction allostérique sur la plus longue distance chez les récepteurs-canaux. La structure complète de ces énormes machines tétramériques dont le poids moléculaire est de 1,3 MDa a été déterminée par cryo-microscopie électronique en 2015 à une résolution de 4,7 Å (Fan et al. 2015). Plus récemment, l'obtention d'une structure

du domaine extracellulaire lié à l'agoniste a permis de mieux comprendre leur mécanisme d'activation (Baker et al. 2017, Hamada et al. 2017). Chez ces récepteurs, la distance entre le site de liaison de l'agoniste et le canal est d'environ 12 nm (Fan et al. 2015, Hamada et al. 2017). Il s'agit cependant dans ce cas de l'ouverture du canal stabilisée par la liaison de l'agoniste sur son site orthostérique et non d'une modulation sur un site allostérique comme dans le cas du récepteur NMDA.

La modulation allostérique des récepteurs NMDA permet l'ajustement de leur activité en fonction du microenvironnement synaptique. En contexte physiologique, les domaines NTD jouent le rôle de senseurs du niveau de zinc, du pH et possiblement des polyamines. Ainsi, la modulation est permise grâce à des domaines extracellulaires de type 'clamshell' (Zhu et al. 2013), une forme de repliement largement représentée dans le monde vivant, notamment par les protéines périplasmiques bactériennes qui captent les nutriments dans leur poche interlobe (Quioco and Ledvina 1996, Felder et al. 1999, Acher and Bertrand 2005). Chez les eucaryotes, les gènes codant pour ces domaines ont fusionné avec ceux de protéines membranaires, aboutissant à des canaux ioniques ou à des récepteurs métabotropiques (Chen et al. 1999a, Janovjak et al. 2011). Chez les mammifères, en plus des récepteurs-canaux du glutamate, les récepteurs couplés aux protéines G de classe C comme les récepteurs mGlu ou GABA<sub>B</sub> sont d'autres exemples du succès évolutif des domaines bilobés (Rondard et al. 2011, Zhu et al. 2013).

## Discussion Générale

La régulation du passage des ions à travers les membranes biologiques est un processus fondamental et indispensable chez toutes les cellules vivantes. Lors de la neurotransmission excitatrice dans le cerveau, le déclenchement de flux ioniques transmembranaires par les récepteurs-canaux du glutamate en réponse à un signal chimique permet la propagation de l'influx nerveux. Les conséquences sur la cellule post-synaptique dépendent de l'amplitude et de la forme du signal électrique généré, et du signal calcique qui l'accompagne. Tous deux sont liés à la quantité et la composition en sous-unités des récepteurs présents à la membrane. Les récepteurs NMDA sont impliqués dans la dépolarisation post-synaptique, mais ce sont surtout les principaux responsables de l'entrée de calcium à la synapse et donc de la plasticité synaptique dont elle est à l'origine.

Ces récepteurs se caractérisent par leur pharmacologie très riche. Le zinc et les polyamines sont des modulateurs endogènes, tous deux spécifiques de certaines sous-unités, soulignant l'importance physiologique de la différence entre les populations de récepteurs. L'intérêt pour le zinc dans la physiologie synaptique est croissant (Vergnano et al. 2014, Anderson et al. 2015, Kalappa et al. 2015, Kalappa and Tzounopoulos 2017, Thackray et al. 2017). L'ifenprodil a été le premier modulateur allostérique de synthèse permettant une sélectivité entre les différents sous-types (Carter et al. 1990, Williams 1993). Même si ces trois modulateurs ciblant la couche NTD sont connus depuis près de 30 ans, (Peters et al. 1987, Westbrook and Mayer 1987, Ransom and Stec 1988), leur mécanisme d'action dans le récepteur entier n'était pas encore élucidé et nous en proposons un premier modèle. Le mouvement de 'rolling' que nous avons caractérisé met en lien, malgré une distance conséquente, les mouvements de la couche distale NTD et les réarrangements du domaine transmembranaire. Il est par ailleurs de

première importance dans le mécanisme d'activation lui-même, comme en témoigne notre obtention d'un récepteur « super-actif » qui montre une efficacité d'ouverture encore jamais observée sur un récepteur de type sauvage (même en présence de modulateurs allostériques positifs).

Durant les 10 dernières années, de nombreux nouveaux modulateurs du récepteur NMDA ont été mis au point, augmentant encore la panoplie pharmacologique permettant de régler son activité. Le site de liaison de certains d'entre eux n'est pas connu mais les premiers modulateurs ciblant la couche ABD ont été découverts, démontrant la possibilité de réguler le récepteur à ce niveau comme cela avait déjà été fait pour les autres récepteurs-canaux du glutamate (Zhu and Paoletti 2015, Hackos et al. 2016, Hackos and Hanson 2017). Les recherches futures détermineront dans quelle mesure leur action s'inscrit dans le modèle que nous proposons. Cependant, pour deux familles de composés, ceux apparentés au TCN-201 qui sont des modulateurs allostériques négatifs des récepteurs contenant la sous-unité GluN2A et ceux apparentés à GNE-6901 qui potentialisent ces mêmes récepteurs, le site de fixation se trouve à l'interface de dimérisation des domaines de liaison de l'agoniste qui n'évolue pas lors du 'rolling'. Leur action est dès lors plutôt à mettre en lien avec les expériences de mutagenèse qui ont été réalisées à cette interface et dont le mécanisme doit encore être replacé dans le cadre des récepteurs entiers dont on connaît depuis la structure. L'inhibition par les protons, très fortement impactée par la mutagenèse à ce niveau reste également mal comprise. Il est d'ailleurs possible que le « site proton » ne soit pas focalisé précisément mais qu'il soit distribué sur plusieurs interfaces, impactant le récepteur de façon globale.

Nos progrès dans la compréhension du récepteur NMDA ont été permis par la parution de différentes structures (quasi) complètes du récepteur. Ce support est indispensable, à la fois pour les études computationnelles et pour les études fonctionnelles. En effet, ces quatre dernières années, les parutions de données structurales sur les récepteurs ionotropiques du glutamate complets se sont enchaînées à un rythme sans précédent, grâce notamment aux avancées récentes de la cryo-microscopie électronique (Callaway 2015, Egelman 2016). Cette méthode, qui repose sur des caméras détectant directement les électrons avec une qualité inédite et sur la capacité d'un logiciel à

distinguer les différentes prises de vue d'une molécule, a l'avantage majeur de pouvoir être appliquée à des protéines natives. Différents états conformationnels dans un même échantillon peuvent être purifiés *in silico* par le programme d'analyse qui les sépare en classe distinctes avant que les images ne soient moyennées pour extraire le signal du bruit.

Cependant, même si la révolution cryo-EM est en cours, il y avait encore en 2016 près de 10000 structures déterminées par cristallographie déposées dans la PDB ('protein data bank', base de donnée protéique) contre un peu plus de 400 pour la microscopie électronique. Même si la nécessité d'obtenir un cristal est une limitation importante et oblige souvent à modifier la protéine de façon substantielle, de nouvelles méthodes voient le jour en cristallographie comme l'utilisation de laser rayons X à électrons libres ('X-ray free electron laser', XFEL), une technique qui rend possible l'utilisation d'une multitude de microcristaux à température ambiante. Du fait de la faible taille des cristaux, la diffusion de ligands à l'intérieur est facilitée, permettant d'étudier plus facilement les changements de conformation induits (Higgins and Lea 2017).

On compte de nombreuses percées récentes dans la détermination de structures complètes des récepteurs-canaux du glutamate. Les premiers récepteurs NMDA ont été obtenus en 2014 (Karakas and Furukawa 2014, Lee et al. 2014), les premiers récepteurs AMPA hétéromériques (Herguedas et al. 2016) ou liés à des protéines auxiliaires en 2016 (Twomey et al. 2016), les premiers récepteurs NMDA trihétéromériques (Lu et al. 2017) et les premiers récepteurs AMPA actifs (i.e. canal ouvert) en 2017 (Twomey et al. 2017a). Il reste cependant un défi majeur qui est celui de l'obtention d'un récepteur NMDA actif malgré sa faible probabilité d'ouverture. Pour le récepteur AMPA, la présence d'un bloqueur de la désensibilisation et de protéines auxiliaires ont été nécessaires à la stabilisation de l'état actif, ces dernières démontrant l'importance des interactions au niveau du domaine transmembranaire pour capturer un pore ouvert. Pour le récepteur NMDA ces interactions ont lieu avec des lipides membranaires, et parvenir à saisir le récepteur dans un environnement lipidique réaliste sera sans doute une avancée majeure vers un état actif. Il faut noter que la structure des dihétéromères GluN1/GluN2A qui ont une plus forte probabilité d'ouverture n'a pas encore été obtenue et les récepteurs GluN1/GluN2B ne sont ouverts que 10% du temps en



présence saturante d'agoniste (Erreger et al. 2005). L'utilisation du mutant super-actif que nous avons découvert et les indications que donnent nos résultats de modélisation sur le domaine transmembranaire peuvent faciliter l'observation d'un canal de récepteur NMDA ouvert.

Les nombreuses structures complètes qui sont disponibles aujourd'hui ne sont pas toutes bien reliées à des états fonctionnels, particulièrement chez les récepteurs AMPA. Des études fonctionnelles, notamment électrophysiologiques, seront essentielles pour permettre de comprendre l'importance physiologique des différents états décrits (Meyerson et al. 2016, Mayer 2017). En particulier, un objectif qui peut sembler aujourd'hui accessible est de parvenir à faire le lien entre les états décrits dans les modèles cinétiques et les états conformationnels des récepteurs (Zhou and Wollmuth 2017). Cet exercice est délicat car les états cinétiques du modèle d'activation du récepteur NMDA, n'ont peut-être pas une stabilité suffisante pour être résolus individuellement en termes de structure. Si l'on exclut les états désensibilisés, les différentes structures récentes publiées pour ce récepteur ne présentent d'ailleurs que deux états conformationnels distincts de la machinerie d'activation (« rollé » et « non-rollé ») alors qu'on dénombre trois états cinétiques fermés et deux ouverts. Ainsi, on ignore si les différents états cinétiques fermés sont les reflets de changements conformationnels quaternaire globaux ou plutôt s'ils sont ceux de changements successifs dans les différentes couches du récepteur. Au vu de nos résultats qui montrent un impact exceptionnel du rolling sur le modèle cinétique, il est très probable que ce mouvement soit impliqué au cours de l'activation. De façon remarquable, l'équilibre entre les états  $C_1$  et  $O_1$  est complètement déplacé vers la droite. Cet équilibre correspond à la transition entre état conducteur et non-conducteur, et implique donc un changement au niveau transmembranaire permettant la perméabilité aux ions alors que nos mutations piègent un changement dans une autre couche, celle des domaines de liaison de l'agoniste. Une hypothèse évidente est une concertation remarquable entre rolling et ouverture du canal mais les deux évènements ne sont pas simultanés dans nos simulations même si l'un provoque l'autre et nous avons donc préféré rester prudent et ne pas relier directement le rolling au schéma cinétique.

De plus amples recherches intégrant différentes approches comme nous l'avons fait sont nécessaires pour relier les états cinétiques à des ensembles de conformations (Mayer 2017, Zhou and Wollmuth 2017). L'une des approches la plus prometteuse serait de parvenir à réaliser des simulations de dynamique moléculaire de longue durée sur le récepteur entier. Il faudrait pour cela un modèle qui ait une résolution atomique, ce qui reste un défi avec les cartes de densité électronique actuelles dont la faible précision ne permet pas de placer les chaînes latérales avec exactitude. Les progrès en cours en cryo-microscopie électronique permettront sans doute de réduire cette limitation. Les simulations de dynamique moléculaire ont déjà conduit à des propositions mettant en jeu des domaines de liaison de l'agoniste semi-ouvert, mais ces dernières considèrent le récepteur comme un dimère sans prendre en compte l'importance de l'organisation tétramérique qu'a révélé notre étude (Zhou 2017, Zhou and Wollmuth 2017). Néanmoins, elles confirment si besoin était que les études *in silico* sont des outils précieux et complémentaires des expériences pour l'étude thermodynamique et cinétique du récepteur (Harpole and Delemotte 2018, Howard et al. 2018). L'intégration des NTDs aux simulations, éludée jusqu'à présent car coûteuse en temps de calcul, permettrait d'étudier également l'influence de ces domaines de première importance chez les récepteurs NMDA en observant à la fois l'effet intrinsèque à leur présence (les différences de Po entre sous-unités) et les conséquences de la liaison de modulateurs.

Le criblage à haut débit, qui n'a pas été abordé dans cette thèse, est un autre domaine où paillasse et modélisation peuvent être associées. Cette technique, utilisée lors des phases initiales de la recherche de nouveaux médicaments vise à identifier des composés actifs dans des chimiothèques de millions de molécules. À titre d'exemple, 2 millions de molécules ont été criblés lors de l'identification des composés TCN (Bettini et al. 2010) et 1,4 millions pour les composés de type 'GNE' (Hackos et al. 2016), sans même avoir recours au criblage virtuel. Ce dernier, qui repose sur le test de bibliothèques de molécules virtuelles vis-à-vis d'un pharmacophore (description abstraite des caractéristiques moléculaires nécessaires à la reconnaissance par la cible) ou vis-à-vis d'une structure (test d'amarrage moléculaire ou 'docking'), est un éventuel préalable puissant au criblage *in vitro* (Lavecchia and Di Giovanni 2013, Lionta et al. 2014). Son application au niveau de l'interface inter-dimère de la couche ABD chez le récepteur

NMDA pourrait être couronnée de succès dans l'identification de nouveaux modulateurs étant donné les effets majeurs des réarrangements à ce niveau que nous avons mis en évidence. Une approche comparant l'affinité des éventuelles touches ('hits') pour les deux conformations que nous avons caractérisées pourrait donner des indices sur la capacité des molécules à stabiliser l'une ou l'autre.

Les récepteurs NMDA sont impliqués dans de nombreuses maladies du système nerveux et les molécules qui les ciblent ont donc un potentiel intérêt thérapeutique. Cependant, du fait du rôle fondamental et de l'expression ubiquitaire de ces récepteurs, seules des substances agissant spécifiquement sur certaines sous-populations semblent susceptibles d'être bien tolérées chez l'homme (Paoletti et al. 2013). Comparativement aux sites orthostériques, la moindre conservation des sites de liaison des modulateurs allostériques entre les différentes sous-unités du récepteur fait d'eux de bons candidats pour une telle spécificité. Le mécanisme allostérique que nous avons mis à jour pourrait par conséquent être ciblé dans la conception de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique en neurologie et en psychiatrie.

# **3. Annexes**

### 3.1. Liste des abréviations

ABD	Domaine de liaison de l'agoniste
Ach	Acétylcholine
AMBER	'Assisted Model Building with Energy Refinement'
AMPA	Acide (S)- $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
AMP <sub>c</sub>	Adénosine monophosphate cyclique
ATP	Adénosine triphosphate
AUC	Aire sous la courbe
CaM	Calmoduline
CaMKII	Protéine kinase II dépendant de la calmoduline
CHARMM	'Chemistry at HARvard Macomolecular Mechanics'
CNQX	6-cyano-7-nitroquinaloxine-2,3-dione
CTD	Domaine C terminal
CPK	Corey-Pauling-Koltun
CTZ	Cyclothiazide
D-AP5 ou D-APV	Acide D-2-amino-5-phosphonopentanoïque
DCKA	Acide 5,7-dichlorokynurénique
DTE	(2R,3S)-1,4-Bis(sulfanyl)butane-2,3-diol
DTNB	5,5'-Disulfanediylbis(2-nitrobenzoic acid)
DTPA	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
DTT	(2S,3S)-1,4-Bis(sulfanyl)butane-2,3-diol
EAAT	Transporteur des acides aminés excitateurs
EC <sub>50</sub>	Concentration produisant 50 % de l'activation maximale
EPSC	Courant postsynaptique excitateur
EPSP	Potentiel postsynaptique excitateur
GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
GABA <sub>A</sub> R	Récepteur-canal au GABA
GABA <sub>B</sub> R	Récepteur métabotrope au GABA
GlyR	Récepteur-canal à la glycine
GROMACS	'GROningen MAchine for Chemical Simulations'
HEK	Humaine embryonnaire de rein
IC <sub>50</sub>	Concentration produisant 50 % de l'inhibition maximale
iGluR	Récepteur ionotrope du glutamate
IP <sub>3</sub>	Inositol triphosphate
kDa	kiloDalton
KNF	Koshland-Nemethy-Filmer
LAOBP	Protéine liant la Lysine/arginine/ornithine
LGIC	Récepteur-canal
LIVBP	Protéine liant la leucine/isoleucine/valine
LL	Lobe du bas
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentiation à long terme
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MTS	Méthane-thiosulfonate

---

mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
ms	milliseconde
MTSEA	2-Aminoethyl methanethiosulfonate
MWC	Monod-Wyman-Changeux
nAChR	Récepteur-canal nicotinique à l'acétylcholine
NAM	Modulateur allostérique négatif
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NMDAR	Récepteur NMDA
NTD	Domaine N-terminal
PAM	Modulateur allostérique positif
PBP	Protéine bactérienne périplasmique
PDB	Base de données des protéines
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
pLGIC	Récepteur-canal pentamérique
Po	Probabilité d'ouverture
PS	Sulfate de pregnenolone
rAMPA	Récepteur AMPA
RCPG	Récepteur couplé aux protéines G
REACH	'Realistic Extension Algorithm via Covariance Hessian'
RMN	Résonance magnétique nucléaire
RMSIP	'Root mean square inner product'
rNMDA	Récepteur NMDA
SNC	Système nerveux central
TMD	Domaine transmembranaire
UL	Lobe du haut
VGLuT	Transporteur du glutamate vésiculaire
wt	De type sauvage
XFEL	Laser rayon X à électrons libres ('X-ray free electron laser').

### **3.2. Liste des mutants testés dans la partie 2.2**

Au niveau de l'ABD de GluN1, toutes les combinaisons de L478C, A480C et N499C sur le lobe D1 avec E707 et S713 sur le lobe D2 ont été testées.

Au niveau de l'ABD de GluN2A, toutes les combinaisons de L411C, E412C, L479C, G483C et T481C sur le lobe D1 avec G712C sur le lobe D2 ont été testées.

Au niveau de l'ABD de GluN2B, toutes les combinaisons de L411C, E412C, L480C, G484C et T482C sur le lobe D1 avec G713C sur le lobe D2 ont été testées.

Au niveau du domaine transmembranaire, les mutations V656C, L657C, D658C, R659C, E661C, E662 et C665C ont été testées pour GluN1, la mutation I654C sur GluN2A et la mutation I665C sur GluN2B.

### 3.3. Protocole de Western blot

Pendant ma thèse, j'ai optimisé le protocole de Western Blot de protéines membranaires sur ovocytes de Xénope utilisé au laboratoire. Après de nombreuses tentatives infructueuses, je présente ici les conditions expérimentales qui ont fonctionné. J'ai notamment utilisé plus de matériel biologique (4 ovocytes par condition) et des anticorps plus concentrés que précédemment au laboratoire.

#### I Oocyte selection and freezing

- Select 4 oocytes/condition with at least 5  $\mu$ A of current (if you need '- $\beta$ mercapto' and '+ $\beta$ mercapto' conditions detected with N1 and 2B Ab, then you need 16 oocytes!).
- Put these oocytes in 1.5mL tubes. Make sure to remove all the liquid with a micropipette.
- Put the tubes with oocytes in liquid nitrogen to flash freeze them (for 1-2min or longer).
- Store at -80°C if you don't continue with the next step straight away.

#### II Oocyte lysis and protein extraction/preparation



**Always keep the oocytes on ice and manipulate at 4°C !**

##### II.1 Oocyte lysis, protein extraction

- Add fresh anti-protease in your loading buffer, see the solutions list at the end of the protocol.
- Add lysis buffer into 1.5mL Eppendorf tubes containing the oocytes (10 $\mu$ L/oocyte  $\rightarrow$  40 $\mu$ L for 4 oocytes).
- Crush them with the special device with clean blue tips until a homogenous suspension is obtained, proceed by steps of 2 seconds with pauses in-between, keeping the oocytes on ice!
- Centrifuge **5 min** at 4°C, 14000 rpm (ou **8 min** à 12000 if max speed)
- Re-suspend the pellet with the pipette by pipetting up and down
- Centrifuge **5 min** at 4°C, 14000 rpm (ou **8 min** à 12000 if max speed)
- Take the supernatant enriched with membrane proteins (35  $\mu$ L for 4 oocytes approximately) and put it into new tubes



## II.2 Loading buffer (Laemmli)

- Add for each volume of sample,  $\frac{1}{2}$  volume of 3X Laemmli loading buffer (2/3 sample + 1/3 loading buffer).
- Heat **15 min** at 65°C (dry heat, not bain marie) or **5 min** at 95°C
- Prepare an additional tube with loading buffer diluted with water (333  $\mu$ L Laemmli + 667  $\mu$ L water) to fill the non-used wells
- Store at -20°C if needed (or -80°C if you want to keep your samples a long time).

## III Gel Loading and migration

### III.1 Set up

- The electrical field used for the migration of proteins produces heat: add ice around the device to cool it, put ice in the block made for it.
- **For high molecular weight NMDA receptor**, use pre-cast gels: Life technologies: NuPAGE 3-8% Tris-acetate Midi Gel 1.0mm; 20 or 12 wells depending on your needs (in the fridge).
- Install the gel box, blocks. Remove the white band covering the hole on the basis of the gel. Place the gels in a way that the whole in it is facing **outside** (the longer plastic side over the wells is facing **outside**).
- Add migration buffer into the blocks. You can use recycled buffer to fill the parts away of your gel

### III.2 Loading



**You will use different antibodies to identify GluN1 and GluN2A/B. Load enough wells!**

- Dilute the ladder with the loading buffer ( $\frac{1}{2}$  volume of loading buffer).
- Load the ladder: add 20 $\mu$ L, 1 ladder / subunit, only used to check the migration and transfer
- Load magic ladder (12  $\mu$ L) (allows to see the bands directly with the secondary Ab)
- Load your samples (30 $\mu$ L/well)
- Fill the “non used” wells with the loading buffer diluted with water

The ladder is visible to the naked eye, place it wisely to know where to cut your membrane if you load two times your samples to detect different subunits. It can also help you with the orientation of the membrane.

### III.3 Migration

There are 2 steps of migration during the western blot:

1. Protein concentration into a straight and thin line: [90-110] V during **10-15 min**, until you get a thin line

2. Separation based on their molecular weight: 130V during **1h or more (2h may be necessary)**. The NMDAR subunits have to be at the middle of the gel, to get that the blue marker has to run out of the gel (NR1 = 100 kDa ; NR2A/2B = 150 kDa)

When the migration is complete:

- Open at the 3 sides the plastic box containing the gel with the tool, remove the plastic slowly to avoid the gel breaking, the gel sometimes sticks on one side
- Cut and remove the top of the gel (pits) and the bottom and the gel (whole) without sliding with the tool.


#### IV Half-dry transfer (under the hood if methanol used in the transfer buffer!)

 **Remember which side of the membrane faces the gel, cut a corner to be sure.**

 **Always wear gloves and manipulate the membrane with the tweezers.**

- Soak the gels during **10-15 min** in the transfer buffer for liquid or half-dry transfer (equilibration)
- Cut the membrane according to the size of the gel (membrane is expensive).
- Activate the membrane by soaking it into methanol (**under the hood**), you can recycle the methanol
- Soak the membrane and filter paper into the transfer buffer (**under the hood**)
- Add a very small amount of transfer buffer into the transfer device (**under the hood**)

From bottom to top, add into the device (orientation is important ! **under the hood**):

 **Remove the bubbles with the appropriate device at each step !**

1. Filter paper soaked into transfer buffer
2. Membrane
3. Gel (easier to manipulate when wet, add buffer on it, and use wet gloves, orientate it wisely!)
4. Filter paper
5. Add some more transfer buffer on top and remove the liquid on the device around the sandwich
6. Use 0.36A for 2 big gels (0.18 for 1 big gel) and a voltage limit at 20V during **1 hour**.

#### V Immunochimistry

- Wash the membrane in the TBST
- Saturate the membrane with 5% milk TBST (5g of milk + 100mL of TBST) during **1 hour** (membrane surface faces upward, balancer speed +/- 70)
- Use a 50 mL Falcon to incubate with the primary antibody
  - GluN1 Ab 1586 1:750 3-4 mL 6 µL in 4 mL TBST + milk
  - GluN2A Ab A12W 1:500 4-mL 8 µL in 4 mL TBST + milk

- GluN2B Ab 59/36 1:500 3-4 mL 8  $\mu$ L in 4 mL TBST + milk

Proteins should be facing the inside

- Incubate overnight in the cold room (4°C) rolling device
- Recycle the Ab
- Wash in TBST 3\***10 min**
- Incubate with the secondary antibody at room temp for **1 hour**  
1  $\mu$ L in 10 mL TBST + milk
  - GluN1 and GluN2B Anti-mouse = Blue
  - GluN2A Anti-rabbit = Red
- Wash in TBST **3\*10 min**
- Image !
- If needed, you can keep the membrane in TBS (or TBST according to Melissa)

### *VI Imaging, book the device in time!*

- Take your membrane, Femto reagent, 1ml pipette and tips, 2 mL tubes, chrono, tweezers, gloves and transparent plastic sheets
- Launch the imager
- Place your membrane on a transparent plastic sheet after removing the TBST on paper
- Mix 1mL of solution A with 1mL of B (1:1) (=H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + luminol)
- Spread out this mix on the membrane (1 mL on each half membrane if you cut your membrane in two parts)
- Incubate 5min
- Add the second transparent plastic sheet
- Put your membranes at the second floor, set in chemi-imaging, make the focus
- Use increment mode every 10 sec, stop the device when you have enough signal
- Save your image
- Take a picture of the gel to see the ladder

## List of the solutions

### Lysis buffer :

20 mM Tris pH 8.0 (=Tris base): 10 $\mu$ L from 1 M stock solution (buffering pH)

50 mM NaCl: 6.25 $\mu$ L from 4 M stock solution

1% DDM (stored at -20°C): 50 $\mu$ L of the 10% stock solution (in the -20°C freezer, Western drawer).

Add Anti-protease cocktail (=complete mini, ROCHE): put ½ pill in 500 $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, dissolve it, then put 50  $\mu$ L in the lysis buffer solution.



**You can keep your lysis buffer frozen but re-add the anti-protease cocktail each time because it's fragile**

Water : for 500 $\mu$ L (383.75 $\mu$ L)

### Laemmli loading buffer :

0.2 M Tris pH 6.8 : 4 mL of the 0.5 M stock solution

30 % glycerol : 3 mL of the 100 % stock solution. *Glycerol in the Laemmli buffer increases the density of the sample so that it will fall to the bottom of the well, minimizing puffing or loss of protein sample in the buffer*

20 % SDS : 3 mL of the 100 % stock solution *Binds to protein (1 SDS molecule / 2 AA) thanks to a long hydrophobic tail. At the other side, a negative moiety linearizes the protein. Proteins are coated with a uniform negative charge and the tertiary structures are destroyed: the migration only depends on the molecular weight of the protein).*

Br-Ph-kik (=bleu de bromophénol) 0.6 mg powder, difficult to weight, put the tip of a pipette in the powder and soak it into the solution. *Bromophenol blue serves as an indicator dye, and migration indicator where one can observe the dye front that runs ahead of the proteins. Bromophenol blue also allows to see the sample during the loading of the gel wells*

Depending on the wanted redox conditions of the SDS-PAGE, add reducing agent: 10 % B-mercaptoethanol (reducing agent, in the fridge) : 1 mL, **under the hood ! Breaks disulfide bonds.**

**Migration buffer:**

Dilute 20x the running buffer (4°C) = **NuPAGE® Tris Acetate SDS Running Buffer** (50 mL in 1 L ddH<sub>2</sub>O).

Otherwise do it yourself (there is no acetate, don't ask why...)

**NuPAGE® Tris Acetate SDS Running Buffer**

*For 1X migration buffer :*

50 mM Tricine (MW = 179.17 g/mol)

50 mM Tris base (MW = 121.1 g/mol)

0.1 % SDS

pH 8.24

1. In order to prepare 500 ml of 20 X NuPAGE®Tris-Acetate SDS Running Buffer, dissolve the following reagents to **300 ml** ultrapure water (powders increase the volume !):

Tricine (1M) : 89.58 g

TrisBase (1M) : 60.55 g

SDS (2%): 50 mL of the 20 % (4X) stock solution.

2. Mix well and adjust the volume to 500 ml with ultrapure water.
3. Store at +4 °C. The buffer is stable for 6 months when stored at +4 °C.
4. Electrophoresis: dilute this buffer to 1X with water (50 mL in 1 L ddH<sub>2</sub>O). The pH of the 1X solution is 8.24. **Do not use acid or base to adjust the pH.**

**Transfer buffer :**

25 mM Tris base : 3.03 g

192 mM Glycine : 14.4 g (buffer)

0.025 % SDS 1.25 mL of the 20 % stock solution

100 mL de MeOH (10 %)

H<sub>2</sub>O to 1 L

**TBS 10X :**

For 1

24 g Tris base (formula weight: 121.1 g)

88 g NaCl (formula weight: 58.4 g)

Dissolve in 900 mL distilled water

pH to 7.6 with 12 N HCl

Add distilled water to a final volume of 1 L

For a 1x solution, mix 1 part of the 10x solution with 9 parts distilled water and adjust pH to 7.6 again.

The final molar concentrations of the 1x solution are 20 mM Tris and 150 mM NaCl.

**TBST :**

TBS + 0.15% Tween-20

Volume final : 1 L

TBS 10x : 100 mL

Tween 20 : 1.5 mL

ddH<sub>2</sub>O : 898.5 mL

## Bibliographie

Acher, F. C. and H. O. Bertrand (2005). "Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif." Biopolymers **80**(2-3): 357-366.^

Acker, T. M., H. Yuan, K. B. Hansen, K. M. Vance, K. K. Ogden, H. S. Jensen, P. B. Burger, P. Mullasseril, J. P. Snyder, D. C. Liotta and S. F. Traynelis (2011). "Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators." Mol Pharmacol **80**(5): 782-795.^

Aizenman, E., K. A. Hartnett and I. J. Reynolds (1990). "Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site." Neuron **5**(6): 841-846.^

Aizenman, E., S. A. Lipton and R. H. Loring (1989). "Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation." Neuron **2**(3): 1257-1263.^

Akazawa, C., R. Shigemoto, Y. Bessho, S. Nakanishi and N. Mizuno (1994). "Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats." J Comp Neurol **347**(1): 150-160.^

Alexander, S. P., A. Mathie and J. A. Peters (2011). "Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition." Br J Pharmacol **164 Suppl 1**: S1-324.^

Amico-Ruvio, S. A., S. E. Murthy, T. P. Smith and G. K. Popescu (2011). "Zinc effects on NMDA receptor gating kinetics." Biophys J **100**(8): 1910-1918.^

Amico-Ruvio, S. A., M. A. Paganelli, J. M. Myers and G. K. Popescu (2012). "Ifenprodil effects on GluN2B-containing glutamate receptors." Mol Pharmacol **82**(6): 1074-1081.^

Anderson, C. T., R. J. Radford, M. L. Zastrow, D. Y. Zhang, U. P. Apfel, S. J. Lippard and T. Tzounopoulos (2015). "Modulation of extrasynaptic NMDA receptors by synaptic and tonic zinc." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(20): E2705-2714.^

Armstrong, N. and E. Gouaux (2000). "Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core." Neuron **28**(1): 165-181.^

Armstrong, N., J. Jasti, M. Beich-Frandsen and E. Gouaux (2006). "Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor." Cell **127**(1): 85-97.^

Ascher, P., P. Bregestovski and L. Nowak (1988). "N-methyl-D-aspartate-activated channels of mouse central neurones in magnesium-free solutions." J Physiol **399**: 207-226.^

Atlason, P. T., M. L. Garside, E. Meddows, P. Whiting and R. A. McIlhinney (2007). "N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor." J Biol Chem **282**(35): 25299-25307.^

Attwell, D. and A. Gibb (2005). "Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses." Nat Rev Neurosci **6**(11): 841-849.^

Auerbach, A. and Y. Zhou (2005). "Gating reaction mechanisms for NMDA receptor channels." J Neurosci **25**(35): 7914-7923.^

Ayalon, G., E. Segev, S. Elgavish and Y. Stern-Bach (2005). "Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly." J Biol Chem **280**(15): 15053-15060.^

Ayalon, G. and Y. Stern-Bach (2001). "Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions." Neuron **31**(1): 103-113.^

Baker, M. R., G. Fan and Serysheva, II (2017). "Structure of IP3R channel: high-resolution insights from cryo-EM." Curr Opin Struct Biol **46**: 38-47.^

Banerjee, A., R. S. Larsen, B. D. Philpot and O. Paulsen (2016). "Roles of Presynaptic NMDA Receptors in Neurotransmission and Plasticity." Trends Neurosci **39**(1): 26-39.^

Banke, T. G., S. M. Dravid and S. F. Traynelis (2005). "Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state." J Neurosci **25**(1): 42-51.^

Banke, T. G. and S. F. Traynelis (2003). "Activation of NR1/NR2B NMDA receptors." Nat Neurosci **6**(2): 144-152.^

Bannister, N. J., T. A. Benke, J. Mellor, H. Scott, E. Gurdal, J. W. Crabtree and J. T. Isaac (2005). "Developmental changes in AMPA and kainate receptor-mediated quantal transmission at thalamocortical synapses in the barrel cortex." J Neurosci **25**(21): 5259-5271.^

Barbara, J. G. (2010). "[The controversy Cajal-Golgi: Stockholm, 1906]." Morphologie **94**(304): 4-7.^

Bass, B. L. (2002). "RNA editing by adenosine deaminases that act on RNA." Annu Rev Biochem **71**: 817-846.^

Belforte, J. E., V. Zsiros, E. R. Sklar, Z. Jiang, G. Yu, Y. Li, E. M. Quinlan and K. Nakazawa (2010). "Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes." Nat Neurosci **13**(1): 76-83.^

- Bellone, C. and R. A. Nicoll (2007). "Rapid bidirectional switching of synaptic NMDA receptors." Neuron **55**(5): 779-785.^
- Berberich, S., V. Jensen, O. Hvalby, P. H. Seeburg and G. Kohr (2007). "The role of NMDAR subtypes and charge transfer during hippocampal LTP induction." Neuropharmacology **52**(1): 77-86.^
- Bertaccini, E. J., J. R. Trudell and E. Lindahl (2007). "Normal-mode analysis of the glycine alpha1 receptor by three separate methods." J Chem Inf Model **47**(4): 1572-1579.^
- Bettini, E., A. Sava, C. Griffante, C. Carignani, A. Buson, A. M. Capelli, M. Negri, F. Andretta, S. A. Senar-Sancho, L. Guiral and F. Cardullo (2010). "Identification and characterization of novel NMDA receptor antagonists selective for NR2A- over NR2B-containing receptors." J Pharmacol Exp Ther **335**(3): 636-644.^
- Bidoret, C., A. Ayon, B. Barbour and M. Casado (2009). "Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(33): 14126-14131.^
- Blanke, M. L. and A. M. VanDongen (2008). "Constitutive activation of the N-methyl-D-aspartate receptor via cleft-spanning disulfide bonds." J Biol Chem **283**(31): 21519-21529.^
- Bloodgood, B. L. and B. L. Sabatini (2008). "Regulation of synaptic signalling by postsynaptic, non-glutamate receptor ion channels." J Physiol **586**(6): 1475-1480.^
- Bouvier, G., C. Bidoret, M. Casado and P. Paoletti (2015). "Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules." Neuroscience **311**: 322-340.^
- Bouzat, C. and S. M. Sine (2017). "Nicotinic acetylcholine receptors at the single-channel level." Br J Pharmacol.^
- Bowie, D., G. D. Lange and M. L. Mayer (1998). "Activity-dependent modulation of glutamate receptors by polyamines." J Neurosci **18**(20): 8175-8185.^
- Bowie, D. and M. L. Mayer (1995). "Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block." Neuron **15**(2): 453-462.^
- Browne, L. E., J. P. Nunes, J. A. Sim, V. Chudasama, L. Bragg, S. Caddick and R. A. North (2014). "Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(1): 521-526.^
- Burnashev, N., H. Monyer, P. H. Seeburg and B. Sakmann (1992). "Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit." Neuron **8**(1): 189-198.^
- Burnashev, N. and P. Szepetowski (2015). "NMDA receptor subunit mutations in neurodevelopmental disorders." Curr Opin Pharmacol **20**: 73-82.^



Callaway, E. (2015). "The revolution will not be crystallized: a new method sweeps through structural biology." Nature **525**(7568): 172-174.^

Carter, C. J., K. G. Lloyd, B. Zivkovic and B. Scatton (1990). "Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral antiischemic agents. III. Evidence for antagonistic effects at the polyamine modulatory site within the N-methyl-D-aspartate receptor complex." J Pharmacol Exp Ther **253**(2): 475-482.^

Casado, M. and P. Ascher (1998). "Opposite modulation of NMDA receptors by lysophospholipids and arachidonic acid: common features with mechanosensitivity." J Physiol **513 ( Pt 2)**: 317-330.^

Changeux, J. P. and A. Christopoulos (2016). "Allosteric Modulation as a Unifying Mechanism for Receptor Function and Regulation." Cell **166**(5): 1084-1102.^

Chen, G. Q., C. Cui, M. L. Mayer and E. Gouaux (1999a). "Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor." Nature **402**(6763): 817-821.^

Chen, L., K. L. Durr and E. Gouaux (2014). "X-ray structures of AMPA receptor-cone snail toxin complexes illuminate activation mechanism." Science **345**(6200): 1021-1026.^

Chen, N., T. Luo and L. A. Raymond (1999b). "Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability." J Neurosci **19**(16): 6844-6854.^

Chen, N., A. Moshaver and L. A. Raymond (1997). "Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition." Mol Pharmacol **51**(6): 1015-1023.^

Chothia, C. and A. M. Lesk (1986). "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins." EMBO J **5**(4): 823-826.^

Clayton, A., C. Siebold, R. J. Gilbert, G. C. Sutton, K. Harlos, R. A. McIlhinney, E. Y. Jones and A. R. Aricescu (2009). "Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors." J Mol Biol **392**(5): 1125-1132.^

Clayton, D. A., M. H. Mesches, E. Alvarez, P. C. Bickford and M. D. Browning (2002). "A hippocampal NR2B deficit can mimic age-related changes in long-term potentiation and spatial learning in the Fischer 344 rat." J Neurosci **22**(9): 3628-3637.^

Collingridge, G. (1987). "Synaptic plasticity. The role of NMDA receptors in learning and memory." Nature **330**(6149): 604-605.^

Colquhoun, D. and B. Sakmann (1985). "Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate." J Physiol **369**: 501-557.^

Conn, P. J., A. Christopoulos and C. W. Lindsley (2009). "Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders." Nat Rev Drug Discov **8**(1): 41-54.^

- Contractor, A., C. Mulle and G. T. Swanson (2011). "Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research." Trends Neurosci **34**(3): 154-163.^
- Costa, B. M., M. W. Irvine, G. Fang, R. J. Eaves, M. B. Mayo-Martin, D. A. Skifter, D. E. Jane and D. T. Monaghan (2010). "A novel family of negative and positive allosteric modulators of NMDA receptors." J Pharmacol Exp Ther **335**(3): 614-621.^
- Cui, Q. and I. Bahar (2006). Normal mode analysis : theory and applications to biological and chemical systems. Boca Raton, Chapman & Hall/CRC.^
- Cull-Candy, S. G. and D. N. Leszkiewicz (2004). "Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses." Sci STKE **2004**(255): re16.^
- Dai, J., L. P. Wollmuth and H. X. Zhou (2015). "Mechanism-Based Mathematical Model for Gating of Ionotropic Glutamate Receptors." J Phys Chem B **119**(34): 10934-10940.^
- Dai, J. and H. X. Zhou (2013). "An NMDA receptor gating mechanism developed from MD simulations reveals molecular details underlying subunit-specific contributions." Biophys J **104**(10): 2170-2181.^
- Dai, J. and H. X. Zhou (2015). "Reduced curvature of ligand-binding domain free-energy surface underlies partial agonism at NMDA receptors." Structure **23**(1): 228-236.^
- Dai, J. and H. X. Zhou (2016). "Semiclosed Conformations of the Ligand-Binding Domains of NMDA Receptors during Stationary Gating." Biophys J **111**(7): 1418-1428.^
- Das, U., J. Kumar, M. L. Mayer and A. J. Plested (2010). "Domain organization and function in GluK2 subtype kainate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(18): 8463-8468.^
- Daw, M. I., N. V. Bannister and J. T. Isaac (2006). "Rapid, activity-dependent plasticity in timing precision in neonatal barrel cortex." J Neurosci **26**(16): 4178-4187.^
- Dehouck, Y. and A. S. Mikhailov (2013). "Effective harmonic potentials: insights into the internal cooperativity and sequence-specificity of protein dynamics." PLoS Comput Biol **9**(8): e1003209.^
- Deisseroth, K. (2011). "Optogenetics." Nat Methods **8**(1): 26-29.^
- Del Castillo, J. and B. Katz (1957). "Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives." Proc R Soc Lond B Biol Sci **146**(924): 369-381.^
- Dingledine, R., K. Borges, D. Bowie and S. F. Traynelis (1999). "The glutamate receptor ion channels." Pharmacol Rev **51**(1): 7-61.^
- Dionne, V. E., J. H. Steinbach and C. F. Stevens (1978). "An analysis of the dose-response relationship at voltage-clamped frog neuromuscular junctions." J Physiol **281**: 421-444.^
- Dong, H. and H. X. Zhou (2011). "Atomistic mechanism for the activation and desensitization of an AMPA-subtype glutamate receptor." Nat Commun **2**: 354.^

Dore, K., J. Aow and R. Malinow (2015). "Agonist binding to the NMDA receptor drives movement of its cytoplasmic domain without ion flow." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(47): 14705-14710.^

Dore, K., I. S. Stein, J. A. Brock, P. E. Castillo, K. Zito and P. J. Sjoström (2017). "Unconventional NMDA Receptor Signaling." J Neurosci **37**(45): 10800-10807.^

Durr, K. L., L. Chen, R. A. Stein, R. De Zorzi, I. M. Folea, T. Walz, H. S. McHaourab and E. Gouaux (2014). "Structure and Dynamics of AMPA Receptor GluA2 in Resting, Pre-Open, and Desensitized States." Cell **158**(4): 778-792.^

Dutta, A., J. Krieger, J. Y. Lee, J. Garcia-Nafria, I. H. Greger and I. Bahar (2015). "Cooperative Dynamics of Intact AMPA and NMDA Glutamate Receptors: Similarities and Subfamily-Specific Differences." Structure **23**(9): 1692-1704.^

Dutta, A., I. H. Shrivastava, M. Sukumaran, I. H. Greger and I. Bahar (2012). "Comparative dynamics of NMDA- and AMPA-glutamate receptor N-terminal domains." Structure **20**(11): 1838-1849.^

Edman, S., S. McKay, L. J. Macdonald, M. Samadi, M. R. Livesey, G. E. Hardingham and D. J. Wyllie (2012). "TCN 201 selectively blocks GluN2A-containing NMDARs in a GluN1 co-agonist dependent but non-competitive manner." Neuropharmacology **63**(3): 441-449.^

Edmonds, B., A. J. Gibb and D. Colquhoun (1995). "Mechanisms of activation of glutamate receptors and the time course of excitatory synaptic currents." Annu Rev Physiol **57**: 495-519.^

Egelman, E. H. (2016). "The Current Revolution in Cryo-EM." Biophys J **110**(5): 1008-1012.^

Elegheert, J., W. Kakegawa, J. E. Clay, N. F. Shanks, E. Behiels, K. Matsuda, K. Kohda, E. Miura, M. Rossmann, N. Mitakidis, J. Motohashi, V. T. Chang, C. Siebold, I. H. Greger, T. Nakagawa, M. Yuzaki and A. R. Aricescu (2016). "Structural basis for integration of GluD receptors within synaptic organizer complexes." Science **353**(6296): 295-299.^

Endele, S., G. Rosenberger, K. Geider, B. Popp, C. Tamer, I. Stefanova, M. Milh, F. Kortum, A. Fritsch, F. K. Pientka, Y. Hellenbroich, V. M. Kalscheuer, J. Kohlhase, U. Moog, G. Rappold, A. Rauch, H. H. Ropers, S. von Spiczak, H. Tonnies, N. Villeneuve, L. Villard, B. Zabel, M. Zenker, B. Laube, A. Reis, D. Wiczorek, L. Van Maldergem and K. Kutsche (2010). "Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes." Nat Genet **42**(11): 1021-1026.^

Erreger, K., S. M. Dravid, T. G. Banke, D. J. Wyllie and S. F. Traynelis (2005). "Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles." J Physiol **563**(Pt 2): 345-358.^

Eyal, E., G. Lum and I. Bahar (2015). "The anisotropic network model web server at 2015 (ANM 2.0)." Bioinformatics **31**(9): 1487-1489.^

- Fan, G., M. L. Baker, Z. Wang, M. R. Baker, P. A. Sinyagovskiy, W. Chiu, S. J. Ludtke and Serysheva, I (2015). "Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy." Nature **527**(7578): 336-341.^
- Farina, A. N., K. Y. Blain, T. Maruo, W. Kwiatkowski, S. Choe and T. Nakagawa (2011). "Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors." J Neurosci **31**(10): 3565-3579.^
- Felder, C. B., R. C. Graul, A. Y. Lee, H. P. Merkle and W. Sadee (1999). "The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors." AAPS PharmSci **1**(2): E2.^
- Fisahn, A., A. Contractor, R. D. Traub, E. H. Buhl, S. F. Heinemann and C. J. McBain (2004). "Distinct roles for the kainate receptor subunits GluR5 and GluR6 in kainate-induced hippocampal gamma oscillations." J Neurosci **24**(43): 9658-9668.^
- Focke, P. J., C. Hein, B. Hoffmann, K. Matulef, F. Bernhard, V. Dotsch and F. I. Valiyaveetil (2016). "Combining in Vitro Folding with Cell Free Protein Synthesis for Membrane Protein Expression." Biochemistry **55**(30): 4212-4219.^
- Foster, D. J. and P. J. Conn (2017). "Allosteric Modulation of GPCRs: New Insights and Potential Utility for Treatment of Schizophrenia and Other CNS Disorders." Neuron **94**(3): 431-446.^
- Frederickson, C. J., S. W. Suh, D. Silva, C. J. Frederickson and R. B. Thompson (2000). "Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron." J Nutr **130**(5S Suppl): 1471S-1483S.^
- Frerking, M., D. Schmitz, Q. Zhou, J. Johansen and R. A. Nicoll (2001). "Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action." J Neurosci **21**(9): 2958-2966.^
- Furukawa, H. and E. Gouaux (2003). "Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core." EMBO J **22**(12): 2873-2885.^
- Furukawa, H., S. K. Singh, R. Mancusso and E. Gouaux (2005). "Subunit arrangement and function in NMDA receptors." Nature **438**(7065): 185-192.^
- Gallagher, M. J., H. Huang, E. R. Grant and D. R. Lynch (1997). "The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor." J Biol Chem **272**(40): 24971-24979.^
- Gebhardt, C. and S. G. Cull-Candy (2006). "Influence of agonist concentration on AMPA and kainate channels in CA1 pyramidal cells in rat hippocampal slices." J Physiol **573**(Pt 2): 371-394.^
- Gibb, A. J. (2004). "NMDA receptor subunit gating--uncovered." Trends Neurosci **27**(1): 7-10; discussion 10.^

Gibb, A. J. and D. Colquhoun (1991). "Glutamate activation of a single NMDA receptor-channel produces a cluster of channel openings." Proc Biol Sci **243**(1306): 39-45.^

Gibb, A. J. and D. Colquhoun (1992). "Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by L-glutamate in cells dissociated from adult rat hippocampus." J Physiol **456**: 143-179.^

Gielen, M., A. Le Goff, D. Stroebel, J. W. Johnson, J. Neyton and P. Paoletti (2008). "Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition." Neuron **57**(1): 80-93.^

Gielen, M., B. Sieglér Retchless, L. Mony, J. W. Johnson and P. Paoletti (2009). "Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits." Nature **459**(7247): 703-707.^

Glasgow, N. G., N. V. Povysheva, A. M. Azofeifa and J. W. Johnson (2017). "Memantine and Ketamine Differentially Alter NMDA Receptor Desensitization." J Neurosci **37**(40): 9686-9704.^

Goldin, M., J. Epsztein, I. Jorquera, A. Represa, Y. Ben-Ari, V. Crepel and R. Cossart (2007). "Synaptic kainate receptors tune oriens-lacunosum moleculare interneurons to operate at theta frequency." J Neurosci **27**(36): 9560-9572.^

Grant, B. J., A. P. Rodrigues, K. M. ElSawy, J. A. McCammon and L. S. Caves (2006). "Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures." Bioinformatics **22**(21): 2695-2696.^

Greger, I. H., P. Akamine, L. Khatri and E. B. Ziff (2006). "Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis." Neuron **51**(1): 85-97.^

Gupta, S., S. Chakraborty, R. Vij and A. Auerbach (2017). "A mechanism for acetylcholine receptor gating based on structure, coupling, phi, and flip." J Gen Physiol **149**(1): 85-103.^

Hackos, D. H. and J. E. Hanson (2017). "Diverse modes of NMDA receptor positive allosteric modulation: Mechanisms and consequences." Neuropharmacology **112**(Pt A): 34-45.^

Hackos, D. H., P. J. Lupardus, T. Grand, Y. Chen, T. M. Wang, P. Reynen, A. Gustafson, H. J. Wallweber, M. Volgraf, B. D. Sellers, J. B. Schwarz, P. Paoletti, M. Sheng, Q. Zhou and J. E. Hanson (2016). "Positive Allosteric Modulators of GluN2A-Containing NMDARs with Distinct Modes of Action and Impacts on Circuit Function." Neuron **89**(5): 983-999.^

Hallett, P. J., A. W. Dunah, P. Ravenscroft, S. Zhou, E. Bezard, A. R. Crossman, J. M. Brotchie and D. G. Standaert (2005). "Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease." Neuropharmacology **48**(4): 503-516.^

- Hamada, K., H. Miyatake, A. Terauchi and K. Mikoshiba (2017). "IP3-mediated gating mechanism of the IP3 receptor revealed by mutagenesis and X-ray crystallography." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(18): 4661-4666.^
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann and F. J. Sigworth (1981). "Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches." Pflugers Arch **391**(2): 85-100.^
- Han, X., H. Tomitori, S. Mizuno, K. Higashi, C. Full, T. Fukiwake, Y. Terui, P. Leewanich, K. Nishimura, T. Toida, K. Williams, K. Kashiwagi and K. Igarashi (2008). "Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor." J Neurochem **107**(6): 1566-1577.^
- Hansen, K. B., H. Furukawa and S. F. Traynelis (2010). "Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain." Mol Pharmacol **78**(4): 535-549.^
- Hansen, K. B., K. K. Ogden and S. F. Traynelis (2012). "Subunit-selective allosteric inhibition of glycine binding to NMDA receptors." J Neurosci **32**(18): 6197-6208.^
- Hansen, K. B., K. K. Ogden, H. Yuan and S. F. Traynelis (2014). "Distinct functional and pharmacological properties of Triheteromeric GluN1/GluN2A/GluN2B NMDA receptors." Neuron **81**(5): 1084-1096.^
- Hansen, K. B., N. Tajima, R. Risgaard, R. E. Perszyk, L. Jorgensen, K. M. Vance, K. K. Ogden, R. P. Clausen, H. Furukawa and S. F. Traynelis (2013). "Structural determinants of agonist efficacy at the glutamate binding site of N-methyl-D-aspartate receptors." Mol Pharmacol **84**(1): 114-127.^
- Hansen, K. B. and S. F. Traynelis (2011). "Structural and mechanistic determinants of a novel site for noncompetitive inhibition of GluN2D-containing NMDA receptors." J Neurosci **31**(10): 3650-3661.^
- Hardingham, G. E. and H. Bading (2010). "Synaptic versus extrasynaptic NMDA receptor signalling: implications for neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **11**(10): 682-696.^
- Harpole, T. J. and L. Delemotte (2018). "Conformational landscapes of membrane proteins delineated by enhanced sampling molecular dynamics simulations." Biochim Biophys Acta **1860**(4): 909-926.^
- Hassaine, G., C. Deluz, L. Grasso, R. Wyss, M. B. Tol, R. Hovius, A. Graff, H. Stahlberg, T. Tomizaki, A. Desmyter, C. Moreau, X. D. Li, F. Poitevin, H. Vogel and H. Nury (2014). "X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT3 receptor." Nature **512**(7514): 276-281.^
- Hatton, C. J. and P. Paoletti (2005). "Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands." Neuron **46**(2): 261-274.^
- Hattori, M. and E. Gouaux (2012). "Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors." Nature **485**(7397): 207-212.^

Herguedas, B., J. Garcia-Nafria, O. Cais, R. Fernandez-Leiro, J. Krieger, H. Ho and I. H. Greger (2016). "Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors." Science **352**(6285): aad3873.^

Herguedas, B., J. Krieger and I. H. Greger (2013). "Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors." Prog Mol Biol Transl Sci **117**: 361-386.^

Higgins, M. K. and S. M. Lea (2017). "On the state of crystallography at the dawn of the electron microscopy revolution." Curr Opin Struct Biol **46**: 95-101.^

Hille, B. (2001). Ion channels of excitable membranes. Sunderland, Mass., Sinauer.^

Hinsen, K. and G. Kneller (1999). "A simplified force field for describing vibrational protein dynamics over the whole frequency range." Journal of Chemical Physics **111**(24): 10766-10769.^

Horak, M., K. Vlcek, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr. (2006). "Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate." Neuroscience **137**(1): 93-102.^

Horak, M., K. Vlcek, M. Petrovic, H. Chodounska and L. Vyklicky, Jr. (2004). "Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors." J Neurosci **24**(46): 10318-10325.^

Horak, M. and R. J. Wenthold (2009). "Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface." J Biol Chem **284**(15): 9683-9691.^

Howard, R. J., V. Carnevale, L. Delemotte, U. A. Hellmich and B. S. Rothberg (2018). "Permeating disciplines: Overcoming barriers between molecular simulations and classical structure-function approaches in biological ion transport." Biochim Biophys Acta **1860**(4): 927-942.^

Huettnner, J. E. and B. P. Bean (1988). "Block of N-methyl-D-aspartate-activated current by the anticonvulsant MK-801: selective binding to open channels." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(4): 1307-1311.^

Hunt, D. L., N. Puente, P. Grandes and P. E. Castillo (2013). "Bidirectional NMDA receptor plasticity controls CA3 output and heterosynaptic metaplasticity." Nat Neurosci **16**(8): 1049-1059.^

Husi, H., M. A. Ward, J. S. Choudhary, W. P. Blackstock and S. G. Grant (2000). "Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes." Nat Neurosci **3**(7): 661-669.^

Iacobucci, G. J. and G. Popescu (2018). "Kinetic models for activation and modulation of NMDA receptor subtypes." Curr Opin Physiol **2**: 114-122.^

- Ichikawa, R., T. Miyazaki, M. Kano, T. Hashikawa, H. Tatsumi, K. Sakimura, M. Mishina, Y. Inoue and M. Watanabe (2002). "Distal extension of climbing fiber territory and multiple innervation caused by aberrant wiring to adjacent spiny branchlets in cerebellar Purkinje cells lacking glutamate receptor delta 2." J Neurosci **22**(19): 8487-8503.^
- Igarashi, K. and K. Kashiwagi (2010). "Modulation of cellular function by polyamines." Int J Biochem Cell Biol **42**(1): 39-51.^
- Irvine, M. W., B. M. Costa, A. Volianskis, G. Fang, L. Ceolin, G. L. Collingridge, D. T. Monaghan and D. E. Jane (2012). "Coumarin-3-carboxylic acid derivatives as potentiators and inhibitors of recombinant and native N-methyl-D-aspartate receptors." Neurochem Int **61**(4): 593-600.^
- Isaac, J. T., M. C. Ashby and C. J. McBain (2007). "The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity." Neuron **54**(6): 859-871.^
- Jackson, M. B. (1986). "Kinetics of unliganded acetylcholine receptor channel gating." Biophys J **49**(3): 663-672.^
- Jackson, M. B. (1988). "Dependence of acetylcholine receptor channel kinetics on agonist concentration in cultured mouse muscle fibres." J Physiol **397**: 555-583.^
- Jahr, C. E. (1992). "High probability opening of NMDA receptor channels by L-glutamate." Science **255**(5043): 470-472.^
- Jahr, C. E. and C. F. Stevens (1987). "Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons." Nature **325**(6104): 522-525.^
- Jang, M. K., D. F. Mierke, S. J. Russek and D. H. Farb (2004). "A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8198-8203.^
- Janovjak, H., G. Sandoz and E. Y. Isacoff (2011). "A modern ionotropic glutamate receptor with a K(+) selectivity signature sequence." Nat Commun **2**: 232.^
- Jatzke, C., J. Watanabe and L. P. Wollmuth (2002). "Voltage and concentration dependence of Ca(2+) permeability in recombinant glutamate receptor subtypes." J Physiol **538**(Pt 1): 25-39.^
- Jespersen, A., N. Tajima, G. Fernandez-Cuervo, E. C. Garnier-Amblard and H. Furukawa (2014). "Structural insights into competitive antagonism in NMDA receptors." Neuron **81**(2): 366-378.^
- Jiang, Y., A. Lee, J. Chen, M. Cadene, B. T. Chait and R. MacKinnon (2002). "The open pore conformation of potassium channels." Nature **417**(6888): 523-526.^
- Jin, R., S. K. Singh, S. Gu, H. Furukawa, A. I. Sobolevsky, J. Zhou, Y. Jin and E. Gouaux (2009). "Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain." EMBO J **28**(12): 1812-1823.^



Johnson, J. W., N. G. Glasgow and N. V. Povysheva (2015). "Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine." Curr Opin Pharmacol **20**: 54-63.^

Jourdain, P., L. H. Bergersen, K. Bhaukaurally, P. Bezzi, M. Santello, M. Domercq, C. Matute, F. Tonello, V. Gundersen and A. Volterra (2007). "Glutamate exocytosis from astrocytes controls synaptic strength." Nat Neurosci **10**(3): 331-339.^

Kakegawa, W., T. Miyazaki, K. Kohda, K. Matsuda, K. Emi, J. Motohashi, M. Watanabe and M. Yuzaki (2009). "The N-terminal domain of GluR2 (GluRdelta2) recruits presynaptic terminals and regulates synaptogenesis in the cerebellum in vivo." J Neurosci **29**(18): 5738-5748.^

Kalappa, B. I., C. T. Anderson, J. M. Goldberg, S. J. Lippard and T. Tzounopoulos (2015). "AMPA receptor inhibition by synaptically released zinc." Proc Natl Acad Sci U S A **112**(51): 15749-15754.^

Kalappa, B. I. and T. Tzounopoulos (2017). "Context-Dependent Modulation of Excitatory Synaptic Strength by Synaptically Released Zinc." eNeuro **4**(1).^

Kalev-Zylinska, M. L., W. Symes, D. Young and M. J. During (2009). "Knockdown and overexpression of NR1 modulates NMDA receptor function." Mol Cell Neurosci **41**(4): 383-396.^

Karakas, E. and H. Furukawa (2014). "Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel." Science **344**(6187): 992-997.^

Karakas, E., N. Simorowski and H. Furukawa (2009). "Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit." EMBO J **28**(24): 3910-3920.^

Karakas, E., N. Simorowski and H. Furukawa (2011). "Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors." Nature **475**(7355): 249-253.^

Karlin, A. (1967). "On the application of "a plausible model" of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine." J Theor Biol **16**(2): 306-320.^

Karplus, M. and J. A. McCammon (2002). "Molecular dynamics simulations of biomolecules." Nat Struct Biol **9**(9): 646-652.^

Kashiwabuchi, N., K. Ikeda, K. Araki, T. Hirano, K. Shibuki, C. Takayama, Y. Inoue, T. Kutsuwada, T. Yagi, Y. Kang and et al. (1995). "Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice." Cell **81**(2): 245-252.^

Kashiwagi, K., J. Fukuchi, J. Chao, K. Igarashi and K. Williams (1996). "An aspartate residue in the extracellular loop of the N-methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons." Mol Pharmacol **49**(6): 1131-1141.^

Katz, B. and S. Thesleff (1957). "A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate." J Physiol **138**(1): 63-80.^

- Kazi, R., J. Dai, C. Sweeney, H. X. Zhou and L. P. Wollmuth (2014). "Mechanical coupling maintains the fidelity of NMDA receptor-mediated currents." Nat Neurosci **17**(7): 914-922.^
- Kazi, R., Q. Gan, I. Talukder, M. Markowitz, C. L. Salussolia and L. P. Wollmuth (2013). "Asynchronous movements prior to pore opening in NMDA receptors." J Neurosci **33**(29): 12052-12066.^
- Khatri, A., P. B. Burger, S. A. Swanger, K. B. Hansen, S. Zimmerman, E. Karakas, D. C. Liotta, H. Furukawa, J. P. Snyder and S. F. Traynelis (2014). "Structural determinants and mechanism of action of a GluN2C-selective NMDA receptor positive allosteric modulator." Mol Pharmacol **86**(5): 548-560.^
- Kidd, F. L. and J. T. Isaac (1999). "Developmental and activity-dependent regulation of kainate receptors at thalamocortical synapses." Nature **400**(6744): 569-573.^
- Kielland, A., G. Bochorishvili, J. Corson, L. Zhang, D. L. Rosin, P. Heggelund and J. J. Zhu (2009). "Activity patterns govern synapse-specific AMPA receptor trafficking between deliverable and synaptic pools." Neuron **62**(1): 84-101.^
- Klepeis, J. L., K. Lindorff-Larsen, R. O. Dror and D. E. Shaw (2009). "Long-timescale molecular dynamics simulations of protein structure and function." Curr Opin Struct Biol **19**(2): 120-127.^
- Klippenstein, V., C. Hoppmann, S. Ye, L. Wang and P. Paoletti (2017). "Optocontrol of glutamate receptor activity by single side-chain photoisomerization." Elife **6**.^
- Kohda, K., Y. Wang and M. Yuzaki (2000). "Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties." Nat Neurosci **3**(4): 315-322.^
- Kohler, M., H. C. Kornau and P. H. Seeburg (1994). "The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B." J Biol Chem **269**(26): 17367-17370.^
- Kohr, G., S. Eckardt, H. Luddens, H. Monyer and P. H. Seeburg (1994). "NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents." Neuron **12**(5): 1031-1040.^
- Koike, M., S. Tsukada, K. Tsuzuki, H. Kijima and S. Ozawa (2000). "Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing." J Neurosci **20**(6): 2166-2174.^
- Koller, M. and S. Urwyler (2010). "Novel N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: a review of compounds patented since 2006." Expert Opin Ther Pat **20**(12): 1683-1702.^
- Koshland, D. E., Jr., G. Nemethy and D. Filmer (1966). "Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits." Biochemistry **5**(1): 365-385.^

Kovacic, P. and R. Somanathan (2010). "Clinical physiology and mechanism of dizocilpine (MK-801): electron transfer, radicals, redox metabolites and bioactivity." *Oxid Med Cell Longev* **3**(1): 13-22.^

Kramer, R. H., A. Mouroto and H. Adesnik (2013). "Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins." *Nat Neurosci* **16**(7): 816-823.^

Krieger, J., I. Bahar and I. H. Greger (2015). "Structure, Dynamics, and Allosteric Potential of Ionotropic Glutamate Receptor N-Terminal Domains." *Biophys J* **109**(6): 1136-1148.^

Kumar, J., P. Schuck, R. Jin and M. L. Mayer (2009). "The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels." *Nat Struct Mol Biol* **16**(6): 631-638.^

Kumar, S. S., A. Bacci, V. Kharazia and J. R. Huguenard (2002). "A developmental switch of AMPA receptor subunits in neocortical pyramidal neurons." *J Neurosci* **22**(8): 3005-3015.^

Kuner, T., P. H. Seeburg and H. R. Guy (2003). "A common architecture for K<sup>+</sup> channels and ionotropic glutamate receptors?" *Trends Neurosci* **26**(1): 27-32.^

Kussius, C. L., N. Kaur and G. K. Popescu (2009). "Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors." *J Neurosci* **29**(21): 6819-6827.^

Kussius, C. L. and G. K. Popescu (2010). "NMDA receptors with locked glutamate-binding clefts open with high efficacy." *J Neurosci* **30**(37): 12474-12479.^

Kwon, H. B. and P. E. Castillo (2008). "Role of glutamate autoreceptors at hippocampal mossy fiber synapses." *Neuron* **60**(6): 1082-1094.^

Lai, T. W., W. C. Shyu and Y. T. Wang (2011). "Stroke intervention pathways: NMDA receptors and beyond." *Trends Mol Med* **17**(5): 266-275.^

Lau, A. Y. and B. Roux (2011). "The hidden energetics of ligand binding and activation in a glutamate receptor." *Nat Struct Mol Biol* **18**(3): 283-287.^

Lau, A. Y., H. Salazar, L. Blachowicz, V. Ghisi, A. J. Plested and B. Roux (2013). "A conformational intermediate in glutamate receptor activation." *Neuron* **79**(3): 492-503.^

Lau, C. G. and R. S. Zukin (2007). "NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders." *Nat Rev Neurosci* **8**(6): 413-426.^

Laurie, D. J. and P. H. Seeburg (1994). "Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA." *J Neurosci* **14**(5 Pt 2): 3180-3194.^

Lavecchia, A. and C. Di Giovanni (2013). "Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review." *Curr Med Chem* **20**(23): 2839-2860.^

Lee, C. H., W. Lu, J. C. Michel, A. Goehring, J. Du, X. Song and E. Gouaux (2014). "NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture." *Nature* **511**(7508): 191-197.^

Legendre, P., C. Rosenmund and G. L. Westbrook (1993). "Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium." J Neurosci **13**(2): 674-684.^

Legendre, P. and G. L. Westbrook (1991). "Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism." Mol Pharmacol **40**(2): 289-298.^

Lemke, J. R., D. Lal, E. M. Reinthaler, I. Steiner, M. Nothnagel, M. Alber, K. Geider, B. Laube, M. Schwake, K. Finsterwalder, A. Franke, M. Schilhabel, J. A. Jahn, H. Muhle, R. Boor, W. Van Paesschen, R. Caraballo, N. Fejerman, S. Weckhuysen, P. De Jonghe, J. Larsen, R. S. Moller, H. Hjalgrim, L. Addis, S. Tang, E. Hughes, D. K. Pal, K. Veri, U. Vaher, T. Talvik, P. Dimova, R. Guerrero Lopez, J. M. Serratosa, T. Linnankivi, A. E. Lehesjoki, S. Ruf, M. Wolff, S. Buerki, G. Wohlrab, J. Kroell, A. N. Datta, B. Fiedler, G. Kurlemann, G. Kluger, A. Hahn, D. E. Haberlandt, C. Kutzer, J. Sperner, F. Becker, Y. G. Weber, M. Feucht, H. Steinbock, B. Neophythou, G. M. Ronen, U. Gruber-Sedlmayr, J. Geldner, R. J. Harvey, P. Hoffmann, S. Herms, J. Altmuller, M. R. Toliat, H. Thiele, P. Nurnberg, C. Wilhelm, U. Stephani, I. Helbig, H. Lerche, F. Zimprich, B. A. Neubauer, S. Biskup and S. von Spiczak (2013). "Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes." Nat Genet **45**(9): 1067-1072.^

Lemoine, D., C. Habermacher, A. Martz, P. F. Mery, N. Bouquier, F. Diverchy, A. Taly, F. Rassendren, A. Specht and T. Grutter (2013). "Optical control of an ion channel gate." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(51): 20813-20818.^

Lerma, J. (1992). "Spermine regulates N-methyl-D-aspartate receptor desensitization." Neuron **8**(2): 343-352.^

Lerma, J. and J. M. Marques (2013). "Kainate receptors in health and disease." Neuron **80**(2): 292-311.^

Lester, R. A. and C. E. Jahr (1992). "NMDA channel behavior depends on agonist affinity." J Neurosci **12**(2): 635-643.^

Lester, R. A., G. Tong and C. E. Jahr (1993). "Interactions between the glycine and glutamate binding sites of the NMDA receptor." J Neurosci **13**(3): 1088-1096.^

Lionta, E., G. Spyrou, D. K. Vassilatis and Z. Cournia (2014). "Structure-based virtual screening for drug discovery: principles, applications and recent advances." Curr Top Med Chem **14**(16): 1923-1938.^

Lomeli, H., R. Sprengel, D. J. Laurie, G. Kohr, A. Herb, P. H. Seeburg and W. Wisden (1993). "The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family." FEBS Lett **315**(3): 318-322.^

Long, S. B., E. B. Campbell and R. Mackinnon (2005). "Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K<sup>+</sup> channel." Science **309**(5736): 897-903.^

Lopez-Blanco, J. R. and P. Chacon (2013). "iMODFIT: efficient and robust flexible fitting based on vibrational analysis in internal coordinates." J Struct Biol **184**(2): 261-270.^

Low, C. M., P. Lyuboslavsky, A. French, P. Le, K. Wyatte, W. H. Thiel, E. M. Marchan, K. Igarashi, K. Kashiwagi, K. Gernert, K. Williams, S. F. Traynelis and F. Zheng (2003). "Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating." Mol Pharmacol **63**(6): 1212-1222.^

Low, C. M., F. Zheng, P. Lyuboslavsky and S. F. Traynelis (2000). "Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(20): 11062-11067.^

Lu, W., J. Du, A. Goehring and E. Gouaux (2017). "Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation." Science **355**(6331).^

Lu, W., Y. Shi, A. C. Jackson, K. Bjorgan, M. J. Doring, R. Sprengel, P. H. Seeburg and R. A. Nicoll (2009). "Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach." Neuron **62**(2): 254-268.^

Magnusson, K. R., B. L. Brim and S. R. Das (2010). "Selective Vulnerabilities of N-methyl-D-aspartate (NMDA) Receptors During Brain Aging." Front Aging Neurosci **2**: 11.^

Mansour, M., N. Nagarajan, R. B. Nehring, J. D. Clements and C. Rosenmund (2001). "Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement." Neuron **32**(5): 841-853.^

Martel, M. A., T. J. Ryan, K. F. Bell, J. H. Fowler, A. McMahon, B. Al-Mubarak, N. H. Komiyama, K. Horsburgh, P. C. Kind, S. G. Grant, D. J. Wyllie and G. E. Hardingham (2012). "The subtype of GluN2 C-terminal domain determines the response to excitotoxic insults." Neuron **74**(3): 543-556.^

Masuko, T., K. Kashiwagi, T. Kuno, N. D. Nguyen, A. J. Pahk, J. Fukuchi, K. Igarashi and K. Williams (1999). "A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein." Mol Pharmacol **55**(6): 957-969.^

Matsuda, K., E. Miura, T. Miyazaki, W. Kakegawa, K. Emi, S. Narumi, Y. Fukazawa, A. Ito-Ishida, T. Kondo, R. Shigemoto, M. Watanabe and M. Yuzaki (2010). "Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer." Science **328**(5976): 363-368.^

Mayer, M. L. (2017). "The Challenge of Interpreting Glutamate-Receptor Ion-Channel Structures." Biophys J **113**(10): 2143-2151.^

Mayer, M. L., L. Vyklicky, Jr. and J. Clements (1989). "Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine." Nature **338**(6214): 425-427.^

Mayer, M. L., G. L. Westbrook and P. B. Guthrie (1984). "Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones." Nature **309**(5965): 261-263.^

- McGurk, J. F., M. V. Bennett and R. S. Zukin (1990). "Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9971-9974.^
- McKay, S., N. H. Griffiths, P. A. Butters, E. B. Thubron, G. E. Hardingham and D. J. Wyllie (2012). "Direct pharmacological monitoring of the developmental switch in NMDA receptor subunit composition using TCN 213, a GluN2A-selective, glycine-dependent antagonist." Br J Pharmacol **166**(3): 924-937.^
- Meddows, E., B. Le Bourdelles, S. Grimwood, K. Wafford, S. Sandhu, P. Whiting and R. A. Mcllhenny (2001). "Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors." J Biol Chem **276**(22): 18795-18803.^
- Mesbahi-Vasey, S., L. Veras, M. Yonkunas, J. W. Johnson and M. G. Kurnikova (2017). "All atom NMDA receptor transmembrane domain model development and simulations in lipid bilayers and water." PLoS One **12**(6): e0177686.^
- Meyerson, J. R., S. Chittori, A. Merk, P. Rao, T. H. Han, M. Serpe, M. L. Mayer and S. Subramaniam (2016). "Structural basis of kainate subtype glutamate receptor desensitization." Nature **537**(7621): 567-571.^
- Meyerson, J. R., J. Kumar, S. Chittori, P. Rao, J. Pierson, A. Bartesaghi, M. L. Mayer and S. Subramaniam (2014). "Structural mechanism of glutamate receptor activation and desensitization." Nature.^
- Miesenbock, G. (2011). "Optogenetic control of cells and circuits." Annu Rev Cell Dev Biol **27**: 731-758.^
- Migues, P. V., M. Cammarota, J. Kavanagh, R. Atkinson, D. A. Powis and J. A. Rostas (2007). "Maturational changes in the subunit composition of AMPA receptors and the functional consequences of their activation in chicken forebrain." Dev Neurosci **29**(3): 232-240.^
- Miller, B., M. Sarantis, S. F. Traynelis and D. Attwell (1992). "Potentiation of NMDA receptor currents by arachidonic acid." Nature **355**(6362): 722-725.^
- Moghaddam, B. and D. Javitt (2012). "From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment." Neuropsychopharmacology **37**(1): 4-15.^
- Mohn, A. R., R. R. Gainetdinov, M. G. Caron and B. H. Koller (1999). "Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia." Cell **98**(4): 427-436.^
- Monod, J., J. Wyman and J. P. Changeux (1965). "On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model." J Mol Biol **12**: 88-118.^

Mony, L., J. N. Kew, M. J. Gunthorpe and P. Paoletti (2009a). "Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential." Br J Pharmacol **157**(8): 1301-1317.^

Mony, L., L. Krzaczkowski, M. Leonetti, A. Le Goff, K. Alarcon, J. Neyton, H. O. Bertrand, F. Acher and P. Paoletti (2009b). "Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by N-methyl-D-aspartate receptors." Mol Pharmacol **75**(1): 60-74.^

Mony, L., S. Zhu, S. Carvalho and P. Paoletti (2011). "Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines." EMBO J **30**(15): 3134-3146.^

Moraes, I., G. Evans, J. Sanchez-Weatherby, S. Newstead and P. D. Stewart (2014). "Membrane protein structure determination - the next generation." Biochim Biophys Acta **1838**(1 Pt A): 78-87.^

Moritsugu, K. and J. C. Smith (2008). "REACH coarse-grained biomolecular simulation: transferability between different protein structural classes." Biophys J **95**(4): 1639-1648.^

Mosbacher, J., R. Schoepfer, H. Monyer, N. Burnashev, P. H. Seeburg and J. P. Ruppersberg (1994). "A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors." Science **266**(5187): 1059-1062.^

Mosley, C. A., T. M. Acker, K. B. Hansen, P. Mullasseril, K. T. Andersen, P. Le, K. M. Vellano, H. Brauner-Osborne, D. C. Liotta and S. F. Traynelis (2010). "Quinazolin-4-one derivatives: A novel class of noncompetitive NR2C/D subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists." J Med Chem **53**(15): 5476-5490.^

Mott, D. D., M. Benveniste and R. J. Dingledine (2008). "pH-dependent inhibition of kainate receptors by zinc." J Neurosci **28**(7): 1659-1671.^

Mott, D. D., J. J. Doherty, S. Zhang, M. S. Washburn, M. J. Fendley, P. Lyuboslavsky, S. F. Traynelis and R. Dingledine (1998). "Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition." Nat Neurosci **1**(8): 659-667.^

Mott, D. D., M. S. Washburn, S. Zhang and R. J. Dingledine (2003). "Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines." J Neurosci **23**(4): 1179-1188.^

Moykkynen, T., S. K. Coleman, A. Semenov and K. Keinanen (2014). "The N-terminal domain modulates alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor desensitization." J Biol Chem **289**(19): 13197-13205.^

Muir, K. W. (2006). "Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with NMDA antagonists." Curr Opin Pharmacol **6**(1): 53-60.^

Mullasseril, P., K. B. Hansen, K. M. Vance, K. K. Ogden, H. Yuan, N. L. Kurtkaya, R. Santangelo, A. G. Orr, P. Le, K. M. Vellano, D. C. Liotta and S. F. Traynelis (2010). "A

subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors." Nat Commun **1**: 90.^

Naur, P., K. B. Hansen, A. S. Kristensen, S. M. Dravid, D. S. Pickering, L. Olsen, B. Vestergaard, J. Egebjerg, M. Gajhede, S. F. Traynelis and J. S. Kastrop (2007). "Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds D-serine and glycine." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(35): 14116-14121.^

Nayeem, N., Y. Zhang, D. K. Schweppe, D. R. Madden and T. Green (2009). "A nondesensitizing kainate receptor point mutant." Mol Pharmacol **76**(3): 534-542.^

Neyton, J. and P. Paoletti (2006). "Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition: limitations of the pharmacological approach." J Neurosci **26**(5): 1331-1333.^

Nowak, L., P. Bregestovski, P. Ascher, A. Herbet and A. Prochiantz (1984). "Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones." Nature **307**(5950): 462-465.^

O'Hara, P. J., P. O. Sheppard, H. Thogersen, D. Venezia, B. A. Haldeman, V. McGrane, K. M. Houamed, C. Thomsen, T. L. Gilbert and E. R. Mulvihill (1993). "The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins." Neuron **11**(1): 41-52.^

Ogden, K. K. and S. F. Traynelis (2013). "Contribution of the M1 transmembrane helix and pre-M1 region to positive allosteric modulation and gating of N-methyl-D-aspartate receptors." Mol Pharmacol **83**(5): 1045-1056.^

Okada, O., K. Odai, T. Sugimoto and E. Ito (2012). "Molecular dynamics simulations for glutamate-binding and cleft-closing processes of the ligand-binding domain of GluR2." Biophys Chem **162**: 35-44.^

Olivella, M., A. Gonzalez, L. Pardo and X. Deupi (2013). "Relation between sequence and structure in membrane proteins." Bioinformatics **29**(13): 1589-1592.^

Paas, Y. (1998). "The macro- and microarchitectures of the ligand-binding domain of glutamate receptors." Trends Neurosci **21**(3): 117-125.^

Pang, X. and H. X. Zhou (2017). "Structural modeling for the open state of an NMDA receptor." J Struct Biol **200**(3): 369-375.^

Paoletti, P. (2011). "Molecular basis of NMDA receptor functional diversity." Eur J Neurosci **33**(8): 1351-1365.^

Paoletti, P. and P. Ascher (1994). "Mechanosensitivity of NMDA receptors in cultured mouse central neurons." Neuron **13**(3): 645-655.^

Paoletti, P., P. Ascher and J. Neyton (1997). "High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors." J Neurosci **17**(15): 5711-5725.^



Paoletti, P., C. Bellone and Q. Zhou (2013). "NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease." Nat Rev Neurosci **14**(6): 383-400.^

Paoletti, P. and J. Neyton (2007). "NMDA receptor subunits: function and pharmacology." Curr Opin Pharmacol **7**(1): 39-47.^

Paoletti, P., J. Neyton and P. Ascher (1995). "Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg<sup>2+</sup>." Neuron **15**(5): 1109-1120.^

Paoletti, P., F. Perin-Dureau, A. Fayyazuddin, A. Le Goff, I. Callebaut and J. Neyton (2000). "Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit." Neuron **28**(3): 911-925.^

Paoletti, P., A. M. Vergnano, B. Barbour and M. Casado (2009). "Zinc at glutamatergic synapses." Neuroscience **158**(1): 126-136.^

Papadakis, M., L. M. Hawkins and F. A. Stephenson (2004). "Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors." J Biol Chem **279**(15): 14703-14712.^

Papouin, T., L. Ladepeche, J. Ruel, S. Sacchi, M. Labasque, M. Hanini, L. Groc, L. Pollegioni, J. P. Mothet and S. H. Oliet (2012). "Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists." Cell **150**(3): 633-646.^

Papouin, T. and S. H. Oliet (2014). "Organization, control and function of extrasynaptic NMDA receptors." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **369**(1654): 20130601.^

Parsons, C. G., A. Stoffler and W. Danysz (2007). "Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system--too little activation is bad, too much is even worse." Neuropharmacology **53**(6): 699-723.^

Perez-Otano, I., R. S. Larsen and J. F. Wesseling (2016). "Emerging roles of GluN3-containing NMDA receptors in the CNS." Nat Rev Neurosci **17**(10): 623-635.^

Perin-Dureau, F., J. Rachline, J. Neyton and P. Paoletti (2002). "Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors." J Neurosci **22**(14): 5955-5965.^

Peters, S., J. Koh and D. W. Choi (1987). "Zinc selectively blocks the action of N-methyl-D-aspartate on cortical neurons." Science **236**(4801): 589-593.^

Petrovic, M. M., S. Viana da Silva, J. P. Clement, L. Vyklicky, C. Mülle, I. M. Gonzalez-Gonzalez and J. M. Henley (2017). "Metabotropic action of postsynaptic kainate receptors triggers hippocampal long-term potentiation." Nat Neurosci **20**(4): 529-539.^

Pickard, L., J. Noel, J. M. Henley, G. L. Collingridge and E. Molnar (2000). "Developmental changes in synaptic AMPA and NMDA receptor distribution and AMPA receptor subunit composition in living hippocampal neurons." J Neurosci **20**(21): 7922-7931.^

- Pierson, T. M., H. Yuan, E. D. Marsh, K. Fuentes-Fajardo, D. R. Adams, T. Markello, G. Golas, D. R. Simeonov, C. Holloman, A. Tankovic, M. M. Karamchandani, J. M. Schreiber, J. C. Mullikin, D. f. t. N. C. S. P. Ph, C. J. Tiffit, C. Toro, C. F. Boerkoel, S. F. Traynelis and W. A. Gahl (2014). "GRIN2A mutation and early-onset epileptic encephalopathy: personalized therapy with memantine." Ann Clin Transl Neurol **1**(3): 190-198.^
- Plested, A. J. and M. L. Mayer (2009). "AMPA receptor ligand binding domain mobility revealed by functional cross linking." J Neurosci **29**(38): 11912-11923.^
- Plested, A. J., R. Vijayan, P. C. Biggin and M. L. Mayer (2008). "Molecular basis of kainate receptor modulation by sodium." Neuron **58**(5): 720-735.^
- Popescu, G. and A. Auerbach (2003). "Modal gating of NMDA receptors and the shape of their synaptic response." Nat Neurosci **6**(5): 476-483.^
- Popescu, G. and A. Auerbach (2004). "The NMDA receptor gating machine: lessons from single channels." Neuroscientist **10**(3): 192-198.^
- Postila, P. A., M. Ylilauri and O. T. Pentikainen (2011). "Full and partial agonism of ionotropic glutamate receptors indicated by molecular dynamics simulations." J Chem Inf Model **51**(5): 1037-1047.^
- Pozhidaeva, N., M. E. Cormier, A. Chaudhari and G. A. Woolley (2004). "Reversible photocontrol of peptide helix content: adjusting thermal stability of the cis state." Bioconjug Chem **15**(6): 1297-1303.^
- Priel, A., S. Selak, J. Lerma and Y. Stern-Bach (2006). "Block of kainate receptor desensitization uncovers a key trafficking checkpoint." Neuron **52**(6): 1037-1046.^
- Qiu, S., X. M. Zhang, J. Y. Cao, W. Yang, Y. G. Yan, L. Shan, J. Zheng and J. H. Luo (2009). "An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors." J Biol Chem **284**(30): 20285-20298.^
- Quioco, F. A. and P. S. Ledvina (1996). "Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation of common themes." Mol Microbiol **20**(1): 17-25.^
- R-Core-Team (2018). R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing.^
- Rachline, J., F. Perin-Dureau, A. Le Goff, J. Neyton and P. Paoletti (2005). "The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B." J Neurosci **25**(2): 308-317.^
- Ransom, R. W. and N. L. Stec (1988). "Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines." J Neurochem **51**(3): 830-836.^

Rauner, C. and G. Kohr (2011). "Triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors constitute the major N-methyl-D-aspartate receptor population in adult hippocampal synapses." J Biol Chem **286**(9): 7558-7566.^

Rebola, N., M. Carta, F. Lanore, C. Blanchet and C. Mulle (2011). "NMDA receptor-dependent metaplasticity at hippocampal mossy fiber synapses." Nat Neurosci **14**(6): 691-693.^

Rebola, N., M. Carta and C. Mulle (2017). "Operation and plasticity of hippocampal CA3 circuits: implications for memory encoding." Nat Rev Neurosci **18**(4): 208-220.^

Regan, M. C., T. Grant, M. J. McDaniel, E. Karakas, J. Zhang, S. F. Traynelis, N. Grigorieff and H. Furukawa (2018). "Structural Mechanism of Functional Modulation by Gene Splicing in NMDA Receptors." Neuron.^

Rock, D. M. and R. L. MacDonald (1992). "Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance." Mol Pharmacol **42**(1): 157-164.^

Rock, D. M. and R. L. Macdonald (1995). "Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels." Annu Rev Pharmacol Toxicol **35**: 463-482.^

Romero-Hernandez, A., N. Simorowski, E. Karakas and H. Furukawa (2016). "Molecular Basis for Subtype Specificity and High-Affinity Zinc Inhibition in the GluN1-GluN2A NMDA Receptor Amino-Terminal Domain." Neuron **92**(6): 1324-1336.^

Rondard, P., C. Goudet, J. Kniazeff, J. P. Pin and L. Prezeau (2011). "The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors." Neuropharmacology **60**(1): 82-92.^

Rosenmund, C., J. D. Clements and G. L. Westbrook (1993). "Nonuniform probability of glutamate release at a hippocampal synapse." Science **262**(5134): 754-757.^

Rosenmund, C., Y. Stern-Bach and C. F. Stevens (1998). "The tetrameric structure of a glutamate receptor channel." Science **280**(5369): 1596-1599.^

Ryan, T. J., M. V. Kopanitsa, T. Indersmitten, J. Nithianantharajah, N. O. Afinowi, C. Pettit, L. E. Stanford, R. Sprengel, L. M. Saksida, T. J. Bussey, T. J. O'Dell, S. G. Grant and N. H. Komiyama (2013). "Evolution of GluN2A/B cytoplasmic domains diversified vertebrate synaptic plasticity and behavior." Nat Neurosci **16**(1): 25-32.^

Sachidhanandam, S., C. Blanchet, Y. Jeantet, Y. H. Cho and C. Mulle (2009). "Kainate receptors act as conditional amplifiers of spike transmission at hippocampal mossy fiber synapses." J Neurosci **29**(15): 5000-5008.^

Saglietti, L., C. Dequidt, K. Kamieniarz, M. C. Rousset, P. Valnegri, O. Thoumine, F. Beretta, L. Fagni, D. Choquet, C. Sala, M. Sheng and M. Passafaro (2007). "Extracellular interactions between GluR2 and N-cadherin in spine regulation." Neuron **54**(3): 461-477.^

- Sahai, M. A. and P. C. Biggin (2011). "Quantifying water-mediated protein-ligand interactions in a glutamate receptor: a DFT study." J Phys Chem B **115**(21): 7085-7096.^
- Sakmann, B. and E. Neher (2009). Single-channel recording. New York, NY, Springer.^
- Salazar, H., C. Eibl, M. Chebli and A. Plested (2017). "Mechanism of partial agonism in AMPA-type glutamate receptors." Nat Commun **8**: 14327.^
- Sali, A. (1995). "Modeling mutations and homologous proteins." Curr Opin Biotechnol **6**(4): 437-451.^
- Sanejouand, Y. H. (2013). "Elastic network models: theoretical and empirical foundations." Methods Mol Biol **924**: 601-616.^
- Savtchenko, L. P. and D. A. Rusakov (2007). "The optimal height of the synaptic cleft." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(6): 1823-1828.^
- Schenk, U. and M. Matteoli (2004). "Presynaptic AMPA receptors: more than just ion channels?" Biol Cell **96**(4): 257-260.^
- Schmid, S. M. and M. Hollmann (2008). "To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels?" Mol Neurobiol **37**(2-3): 126-141.^
- Schuler, T., I. Mesic, C. Madry, I. Bartholomäus and B. Laube (2008). "Formation of NR1/NR2 and NR1/NR3 heterodimers constitutes the initial step in N-methyl-D-aspartate receptor assembly." J Biol Chem **283**(1): 37-46.^
- Serraz, B., T. Grand and P. Paoletti (2016). "Altered zinc sensitivity of NMDA receptors harboring clinically-relevant mutations." Neuropharmacology **109**: 196-204.^
- Sgambato-Faure, V. and M. A. Cenci (2012). "Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease." Prog Neurobiol **96**(1): 69-86.^
- Siegler Retchless, B., W. Gao and J. W. Johnson (2012). "A single GluN2 subunit residue controls NMDA receptor channel properties via intersubunit interaction." Nat Neurosci **15**(3): 406-413, S401-402.^
- Skjaerven, L., X. Q. Yao, G. Scarabelli and B. J. Grant (2014). "Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D." BMC Bioinformatics **15**: 399.^
- Smith, T. C. and J. R. Howe (2000). "Concentration-dependent substate behavior of native AMPA receptors." Nat Neurosci **3**(10): 992-997.^
- Smith, T. C., L. Y. Wang and J. R. Howe (2000). "Heterogeneous conductance levels of native AMPA receptors." J Neurosci **20**(6): 2073-2085.^

Sobolevsky, A. I., M. L. Prodromou, M. V. Yelshansky and L. P. Wollmuth (2007). "Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating." J Gen Physiol **129**(6): 509-525.^

Sobolevsky, A. I., M. P. Rosconi and E. Gouaux (2009). "X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor." Nature **462**(7274): 745-756.^

Sommer, B., K. Keinanen, T. A. Verdoorn, W. Wisden, N. Burnashev, A. Herb, M. Kohler, T. Takagi, B. Sakmann and P. H. Seeburg (1990). "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." Science **249**(4976): 1580-1585.^

Sommer, B., M. Kohler, R. Sprengel and P. H. Seeburg (1991). "RNA editing in brain controls a determinant of ion flow in glutamate-gated channels." Cell **67**(1): 11-19.^

Song, X., M. O. Jensen, V. Jogini, R. A. Stein, C. H. Lee, H. S. McHaourab, D. E. Shaw and E. Gouaux (2018). "Mechanism of NMDA receptor channel block by MK-801 and memantine." Nature.^

Stern, P., P. Behe, R. Schoepfer and D. Colquhoun (1992). "Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors." Proc Biol Sci **250**(1329): 271-277.^

Stern, P., M. Cik, D. Colquhoun and F. A. Stephenson (1994). "Single channel properties of cloned NMDA receptors in a human cell line: comparison with results from *Xenopus* oocytes." J Physiol **476**(3): 391-397.^

Stoll, L., J. Hall, N. Van Buren, A. Hall, L. Knight, A. Morgan, S. Zuger, H. Van Deusen and L. Gentile (2007). "Differential regulation of ionotropic glutamate receptors." Biophys J **92**(4): 1343-1349.^

Stroebel, D., S. Carvalho, T. Grand, S. Zhu and P. Paoletti (2014). "Controlling NMDA receptor subunit composition using ectopic retention signals." J Neurosci **34**(50): 16630-16636.^

Stroebel, D., S. Carvalho and P. Paoletti (2011). "Functional evidence for a twisted conformation of the NMDA receptor GluN2A subunit N-terminal domain." Neuropharmacology **60**(1): 151-158.^

Stroebel, D., M. Casado and P. Paoletti (2018). "Triheteromeric NMDA receptors: from structure to synaptic physiology." Curr Opin Physiol **2**: 1-12.^

Suhre, K. and Y. H. Sanejouand (2004). "EINemo: a normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement." Nucleic Acids Res **32**(Web Server issue): W610-614.^

Sullivan, J. M., S. F. Traynelis, H. S. Chen, W. Escobar, S. F. Heinemann and S. A. Lipton (1994). "Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor." Neuron **13**(4): 929-936.^

- Sun, Y., R. Olson, M. Horning, N. Armstrong, M. Mayer and E. Gouaux (2002). "Mechanism of glutamate receptor desensitization." Nature **417**(6886): 245-253.^
- Suzuki, Y., T. A. Goetze, D. Stroebel, D. Balasuriya, S. H. Yoshimura, R. M. Henderson, P. Paoletti, K. Takeyasu and J. M. Edwardson (2013). "Visualization of structural changes accompanying activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors using fast-scan atomic force microscopy imaging." J Biol Chem **288**(2): 778-784.^
- Swanger, S. A., K. M. Vance, T. M. Acker, S. S. Zimmerman, J. O. DiRaddo, S. J. Myers, C. Bundgaard, C. A. Mosley, S. L. Summer, D. S. Menaldino, H. S. Jensen, D. C. Liotta and S. F. Traynelis (2018). "A Novel Negative Allosteric Modulator Selective for GluN2C/2D-Containing NMDA Receptors Inhibits Synaptic Transmission in Hippocampal Interneurons." ACS Chem Neurosci **9**(2): 306-319.^
- Tajima, N., E. Karakas, T. Grant, N. Simorowski, R. Diaz-Avalos, N. Grigorieff and H. Furukawa (2016). "Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil." Nature **534**(7605): 63-68.^
- Takasu, M. A., M. B. Dalva, R. E. Zigmond and M. E. Greenberg (2002). "Modulation of NMDA receptor-dependent calcium influx and gene expression through EphB receptors." Science **295**(5554): 491-495.^
- Talukder, I., R. Kazi and L. P. Wollmuth (2011). "GluN1-specific redox effects on the kinetic mechanism of NMDA receptor activation." Biophys J **101**(10): 2389-2398.^
- Tang, C. M., M. Dichter and M. Morad (1990). "Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H+." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6445-6449.^
- Tansey, E. M. (1997). "Not committing barbarisms: Sherrington and the synapse, 1897." Brain Res Bull **44**(3): 211-212.^
- Thackray, S. E., B. B. McAllister and R. H. Dyck (2017). "Behavioral characterization of female zinc transporter 3 (ZnT3) knockout mice." Behav Brain Res **321**: 36-49.^
- Tippmann, S. (2015). "Programming tools: Adventures with R." Nature **517**(7532): 109-110.^
- Tirion, M. M. (1996). "Large Amplitude Elastic Motions in Proteins from a Single-Parameter, Atomic Analysis." Phys Rev Lett **77**(9): 1905-1908.^
- Tombaugh, G. C. and R. M. Sapolsky (1993). "Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology." J Neurochem **61**(3): 793-803.^
- Tovar, K. R., M. J. McGinley and G. L. Westbrook (2013). "Triheteromeric NMDA receptors at hippocampal synapses." J Neurosci **33**(21): 9150-9160.^
- Traynelis, S. F., M. F. Burgess, F. Zheng, P. Lyuboslavsky and J. L. Powers (1998). "Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit." J Neurosci **18**(16): 6163-6175.^

Traynelis, S. F. and S. G. Cull-Candy (1990). "Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons." Nature **345**(6273): 347-350.^

Traynelis, S. F. and S. G. Cull-Candy (1991). "Pharmacological properties and H<sup>+</sup> sensitivity of excitatory amino acid receptor channels in rat cerebellar granule neurones." J Physiol **433**: 727-763.^

Traynelis, S. F., M. Hartley and S. F. Heinemann (1995). "Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines." Science **268**(5212): 873-876.^

Traynelis, S. F., L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers and R. Dingledine (2010). "Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function." Pharmacol Rev **62**(3): 405-496.^

Twomey, E. C. and A. I. Sobolevsky (2018). "Structural Mechanisms of Gating in Ionotropic Glutamate Receptors." Biochemistry **57**(3): 267-276.^

Twomey, E. C., M. V. Yelshanskaya, R. A. Grassucci, J. Frank and A. I. Sobolevsky (2016). "Elucidation of AMPA receptor-stargazin complexes by cryo-electron microscopy." Science **353**(6294): 83-86.^

Twomey, E. C., M. V. Yelshanskaya, R. A. Grassucci, J. Frank and A. I. Sobolevsky (2017a). "Channel opening and gating mechanism in AMPA-subtype glutamate receptors." Nature **549**(7670): 60-65.^

Twomey, E. C., M. V. Yelshanskaya, R. A. Grassucci, J. Frank and A. I. Sobolevsky (2017b). "Structural Bases of Desensitization in AMPA Receptor-Auxiliary Subunit Complexes." Neuron **94**(3): 569-580 e565.^

Uemura, T., S. J. Lee, M. Yasumura, T. Takeuchi, T. Yoshida, M. Ra, R. Taguchi, K. Sakimura and M. Mishina (2010). "Trans-synaptic interaction of GluRdelta2 and Neurexin through Cbln1 mediates synapse formation in the cerebellum." Cell **141**(6): 1068-1079.^

Uemura, T. and M. Mishina (2008). "The amino-terminal domain of glutamate receptor delta2 triggers presynaptic differentiation." Biochem Biophys Res Commun **377**(4): 1315-1319.^

Valadie, H., J. J. Lacapre, Y. H. Sanejouand and C. Etchebest (2003). "Dynamical properties of the MscL of Escherichia coli: a normal mode analysis." J Mol Biol **332**(3): 657-674.^

Valbuena, S. and J. Lerma (2016). "Non-canonical Signaling, the Hidden Life of Ligand-Gated Ion Channels." Neuron **92**(2): 316-329.^

Van Der Spoel, D., E. Lindahl, B. Hess, G. Groenhof, A. E. Mark and H. J. Berendsen (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." J Comput Chem **26**(16): 1701-1718.^

- Vergnano, A. M., N. Rebola, L. P. Savtchenko, P. S. Pinheiro, M. Casado, B. L. Kieffer, D. A. Rusakov, C. Mulle and P. Paoletti (2014). "Zinc dynamics and action at excitatory synapses." Neuron **82**(5): 1101-1114.^
- Vijayan, R., A. J. Plested, M. L. Mayer and P. C. Biggin (2009). "Selectivity and cooperativity of modulatory ions in a neurotransmitter receptor." Biophys J **96**(5): 1751-1760.^
- Vijayan, R., M. A. Sahai, T. Czajkowski and P. C. Biggin (2010). "A comparative analysis of the role of water in the binding pockets of ionotropic glutamate receptors." Phys Chem Chem Phys **12**(42): 14057-14066.^
- Villarroel, A., N. Burnashev and B. Sakmann (1995). "Dimensions of the narrow portion of a recombinant NMDA receptor channel." Biophys J **68**(3): 866-875.^
- Vinothkumar, K. R. (2015). "Membrane protein structures without crystals, by single particle electron cryomicroscopy." Curr Opin Struct Biol **33**: 103-114.^
- Vogt, K., J. Mellor, G. Tong and R. Nicoll (2000). "The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses." Neuron **26**(1): 187-196.^
- Volgraf, M., P. Gorostiza, R. Numano, R. H. Kramer, E. Y. Isacoff and D. Trauner (2006). "Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch." Nat Chem Biol **2**(1): 47-52.^
- Wang, D., Z. Cui, Q. Zeng, H. Kuang, L. P. Wang, J. Z. Tsien and X. Cao (2009). "Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats." PLoS One **4**(10): e7486.^
- Wang, T. M., B. M. Brown, L. Deng, B. D. Sellers, P. J. Lupardus, H. J. A. Wallweber, A. Gustafson, E. Wong, M. Volgraf, J. B. Schwarz, D. H. Hackos and J. E. Hanson (2017). "A novel NMDA receptor positive allosteric modulator that acts via the transmembrane domain." Neuropharmacology **121**: 204-218.^
- Watanabe, J., C. Beck, T. Kuner, L. S. Premkumar and L. P. Wollmuth (2002). "DRPEER: a motif in the extracellular vestibule conferring high Ca<sup>2+</sup> flux rates in NMDA receptor channels." J Neurosci **22**(23): 10209-10216.^
- Watt, A. J., M. C. van Rossum, K. M. MacLeod, S. B. Nelson and G. G. Turrigiano (2000). "Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses." Neuron **26**(3): 659-670.^
- Weaver, C. E., M. B. Land, R. H. Purdy, K. G. Richards, T. T. Gibbs and D. H. Farb (2000). "Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca<sup>2+</sup> accumulation and cell death." J Pharmacol Exp Ther **293**(3): 747-754.^



Westbrook, G. L. and M. L. Mayer (1987). "Micromolar concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons." Nature **328**(6131): 640-643.^

Weston, M. C., P. Schuck, A. Ghosal, C. Rosenmund and M. L. Mayer (2006). "Conformational restriction blocks glutamate receptor desensitization." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1120-1127.^

Wilkinson, D. (2012). "A review of the effects of memantine on clinical progression in Alzheimer's disease." Int J Geriatr Psychiatry **27**(8): 769-776.^

Wilkinson, D., Y. Wirth and C. Goebel (2014). "Memantine in patients with moderate to severe Alzheimer's disease: meta-analyses using realistic definitions of response." Dement Geriatr Cogn Disord **37**(1-2): 71-85.^

Williams, K. (1993). "Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors." Mol Pharmacol **44**(4): 851-859.^

Williams, K. (1997). "Modulation and block of ion channels: a new biology of polyamines." Cell Signal **9**(1): 1-13.^

Williams, K., K. Kashiwagi, J. Fukuchi and K. Igarashi (1995). "An acidic amino acid in the N-methyl-D-aspartate receptor that is important for spermine stimulation." Mol Pharmacol **48**(6): 1087-1098.^

Williams, K., A. M. Zappia, D. B. Pritchett, Y. M. Shen and P. B. Molinoff (1994). "Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits." Mol Pharmacol **45**(5): 803-809.^

Wo, Z. G. and R. E. Oswald (1995). "Unraveling the modular design of glutamate-gated ion channels." Trends Neurosci **18**(4): 161-168.^

Wollmuth, L. P. (2018). "Ion permeation in ionotropic glutamate receptors: Still dynamic after all these years." Curr Opin Physiol **2**: 36-41.^

Wood, M. W., H. M. VanDongen and A. M. VanDongen (1995). "Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4882-4886.^

Yamazaki, M., K. Araki, A. Shibata and M. Mishina (1992). "Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family." Biochem Biophys Res Commun **183**(2): 886-892.^

Yang, Q., G. Zhu, D. Liu, J. G. Ju, Z. H. Liao, Y. X. Xiao, Y. Zhang, N. Chao, J. Wang, W. Li, J. H. Luo and S. T. Li (2017). "Extrasynaptic NMDA receptor dependent long-term potentiation of hippocampal CA1 pyramidal neurons." Sci Rep **7**(1): 3045.^

Yasumura, M., T. Yoshida, S. J. Lee, T. Uemura, J. Y. Joo and M. Mishina (2012). "Glutamate receptor delta1 induces preferentially inhibitory presynaptic differentiation

of cortical neurons by interacting with neurexins through cerebellin precursor protein subtypes." J Neurochem **121**(5): 705-716.^

Yelshanskaya, M. V., M. Li and A. I. Sobolevsky (2014). "Structure of an agonist-bound ionotropic glutamate receptor." Science **345**(6200): 1070-1074.^

Yuan, H., K. B. Hansen, K. M. Vance, K. K. Ogden and S. F. Traynelis (2009). "Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain." J Neurosci **29**(39): 12045-12058.^

Yuan, H., S. J. Myers, G. Wells, K. L. Nicholson, S. A. Swanger, P. Lyuboslavsky, Y. A. Tahirovic, D. S. Menaldino, T. Ganesh, L. J. Wilson, D. C. Liotta, J. P. Snyder and S. F. Traynelis (2015). "Context-dependent GluN2B-selective inhibitors of NMDA receptor function are neuroprotective with minimal side effects." Neuron **85**(6): 1305-1318.^

Zarei, M. M. and J. A. Dani (1995). "Structural basis for explaining open-channel blockade of the NMDA receptor." J Neurosci **15**(2): 1446-1454.^

Zhang, L., X. Zheng, M. C. Paupard, A. P. Wang, L. Santchi, L. K. Friedman, R. S. Zukin and M. V. Bennett (1994). "Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(23): 10883-10887.^

Zheng, F., K. Erreger, C. M. Low, T. Banke, C. J. Lee, P. J. Conn and S. F. Traynelis (2001). "Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A." Nat Neurosci **4**(9): 894-901.^

Zheng, F., M. B. Gingrich, S. F. Traynelis and P. J. Conn (1998). "Tyrosine kinase potentiates NMDA receptor currents by reducing tonic zinc inhibition." Nat Neurosci **1**(3): 185-191.^

Zheng, W., H. Wen, G. J. Iacobucci and G. K. Popescu (2017). "Probing the Structural Dynamics of the NMDA Receptor Activation by Coarse-Grained Modeling." Biophys J **112**(12): 2589-2601.^

Zhou, H. X. (2017). "Gating Motions and Stationary Gating Properties of Ionotropic Glutamate Receptors: Computation Meets Electrophysiology." Acc Chem Res **50**(4): 814-822.^

Zhou, H. X. and L. P. Wollmuth (2017). "Advancing NMDA Receptor Physiology by Integrating Multiple Approaches." Trends Neurosci **40**(3): 129-137.^

Zhu, S. and E. Gouaux (2017). "Structure and symmetry inform gating principles of ionotropic glutamate receptors." Neuropharmacology **112**(Pt A): 11-15.^

Zhu, S. and P. Paoletti (2015). "Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms." Curr Opin Pharmacol **20**: 14-23.^

Zhu, S., R. A. Stein, C. Yoshioka, C. H. Lee, A. Goehring, H. S. McHaourab and E. Gouaux (2016). "Mechanism of NMDA Receptor Inhibition and Activation." Cell **165**(3): 704-714.^

Zhu, S., D. Stroebel, C. A. Yao, A. Taly and P. Paoletti (2013). "Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain." Nat Struct Mol Biol **20**(4): 477-485.^

Zimmerman, S. S., A. Khatri, E. C. Garnier-Amblard, P. Mullasseril, N. L. Kurtkaya, S. Gyoneva, K. B. Hansen, S. F. Traynelis and D. C. Liotta (2014). "Design, synthesis, and structure-activity relationship of a novel series of GluN2C-selective potentiators." J Med Chem **57**(6): 2334-2356.^

Zuckerman, D. M. (2011). "Equilibrium sampling in biomolecular simulations." Annu Rev Biophys **40**: 41-62.^



## Résumé

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont responsables de la vaste majorité de la neurotransmission excitatrice rapide dans le système nerveux central. Parmi eux, les récepteurs NMDA (rNMDA) sont les médiateurs de la plasticité synaptique, fondement cellulaire des processus d'apprentissage et de mémoire. Leurs dysfonctionnements sont impliqués dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques comme les maladies d'Alzheimer et de Parkinson, l'épilepsie et la schizophrénie.

Les rNMDA forment des complexes hétérotétramériques massifs (>500 kDa) dotés de propriétés allostériques uniques grâce à un ensemble de 8 domaines extracellulaires bilobés organisés en deux strates superposées : la couche de domaines N-terminaux (NTD) et la couche de domaines de liaison de l'agoniste (ABD). Malgré un nombre croissant de structures complètes de rNMDA, le mécanisme de transduction permettant aux interactions entre ces domaines de contrôler l'activité du récepteur restait inconnu.

En combinant analyse expérimentale et computationnelle, nous montrons qu'un mouvement de roulis à l'interface entre les deux dimères de la couche d'ABD est un déterminant clé du processus d'activation et de modulation des rNMDA. Cette rotation des deux dimères d'ABD constitue un commutateur conformationnel qui règle l'ouverture du canal en fonction de la conformation des NTD situés à l'opposé.

Ce travail révèle comment des changements conformationnels concertés entre couches de domaines gouvernent l'activité des rNMDA. Il illumine notre compréhension d'un récepteur synaptique majeur du système nerveux central et ouvre la voie à la conception de nouveaux agents pharmacologiques ciblant le mécanisme allostérique élucidé.

## Mots Clés

NMDA, glutamate, récepteur membranaire, canal ionique, allostérie, synapse, électrophysiologie, modélisation, Analyse en modes normaux, roulis

## Abstract

Ionotropic glutamate receptors are responsible for the vast majority of fast excitatory neurotransmission in the central nervous system. Among them, NMDA receptors (NMDARs) are key mediators of synaptic plasticity, which is considered as the cellular basis of learning and memory. NMDAR dysfunction is implicated in numerous neurological and psychiatric brain disorders such as Alzheimer and Parkinson's disease, epilepsy and schizophrenia.

NMDAR form massive heterotetrameric complexes (>500 kDa) endowed with unique allosteric capacity provided by a cluster of eight extracellular clamshell-like domains arranged as two superimposed layers: the N-terminal domain (NTD) layer and the agonist-binding domain (ABD) layer. Despite an increasing number of full-length NMDAR structures, the transduction mechanism by which these domains interact in an intact receptor to control its activity remained poorly understood.

Combining experimental and in silico analysis, we identify a rolling motion at an interface between the two constitute dimers in the ABD layer as a key determinant in NMDAR activation and modulation pathways. This rotation of the two ABD dimers acts as a conformational switch that tunes channel opening depending on the conformation of the membrane-distal NTD layer.

This work unveils how NMDAR domains move and operate in a concerted manner to transduce conformational changes between layers and command receptor activity. It illuminates our understanding of a major synaptic receptor of the central nervous system and paves the way for the development of new pharmacological tools targeting the elucidated allosteric mechanism.

## Keywords

NMDA, glutamate, membrane receptor, ion channel, allostery, synapse, electrophysiology, modeling, Normal mode analysis, rolling