



HAL
open science

Applications de la fluorescence pour la caractérisation structurale et dynamique d'intermédiaires conformationnels des récepteurs-canaux pentamériques

Solène Lefebvre

► **To cite this version:**

Solène Lefebvre. Applications de la fluorescence pour la caractérisation structurale et dynamique d'intermédiaires conformationnels des récepteurs-canaux pentamériques. Biophysique. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS207 . tel-03030123

HAL Id: tel-03030123

<https://theses.hal.science/tel-03030123v1>

Submitted on 29 Nov 2020

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

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

THESE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Présentée par
Solène LEFEBVRE

Applications de la fluorescence pour la caractérisation structurale et dynamique d'intermédiaires conformationnels des récepteurs-canaux pentamériques

Thèse effectuée au sein du groupe Récepteurs-Canaux à l'Institut Pasteur, Paris
École doctorale ED3C : Cerveau, Cognition, Comportement

Thèse soutenue le 20 septembre 2019

Composition du jury

Dr KELLENBERGER Stephan
Dr GRUTTER Thomas
Dr MONY Laetitia
Dr CECCHINI Marco
Pr VENIEN-BRYAN Catherine
Dr CORRINGER Pierre-Jean

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Examinatrice
Directeur de Thèse

Résumé

Les récepteurs canaux pentamériques (RCPs) sont des protéines membranaires présentes à la fois chez les eucaryotes comme les récepteurs à la glycine GlyR, et à la sérotonine 5-HT₃R et chez certains procaryotes comme GLIC. Chez l'Homme, ces récepteurs sont impliqués dans la transmission synaptique rapide, ils sont une cible thérapeutique importante par exemple pour les anesthésiques généraux ou les anxiolytiques, et leur mutation entraîne des pathologies sévères telles que des myasthénies, des épilepsies ou des maladies neurologiques rares comme l'hyperékplexie.

La liaison de l'agoniste sur ces récepteurs favorise des réorganisations structurales qui amènent à un état actif pour lequel le canal est ouvert et permet le passage d'ions. Les propriétés structurales et fonctionnelles de ces récepteurs ont été étudiées et combinées dans ce travail pour explorer la dynamique conformationnelle des RCPs.

Plusieurs approches par fluorescence ont été utilisées pour : 1) déterminer la cinétique de pré-activation de GLIC qui se passe à l'échelle des microsecondes, 2) mesurer l'effet de mutations sur GLIC qui impactent profondément les réorganisations globales ce qui démontre l'importance du couplage allostérique des différentes régions de la protéine pour permettre son activation, 3) caractériser des états intermédiaires des RCPs eucaryotes qui se trouvent en amont de l'activation.

Combiné à l'analyse structurale, les données de fluorescence obtenues permettent de détailler des intermédiaires conformationnels de l'activation des RCPs et d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires qui régissent le fonctionnement normal et pathologique de ces récepteurs.

Summary

Pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs) are membrane proteins found in both eukaryotes such as the glycine and serotonin receptors and in some prokaryotes like GLIC. In Humans, these receptors are involved in fast synaptic transmission, they are a major therapeutic target for general anesthetics or anxiolytics and their mutation lead to severe diseases such as myasthenia, epilepsies or rare neurological diseases like hyperekplexia.

Agonist binding on these receptors promote structural reorganizations leading to the active state with an open pore allowing ion flux. Structural and functional properties of these receptors have been studied and combined in this work to explore conformational dynamics of pLGICs.

Several approaches have been used to: 1) determine pre-activation kinetics of GLIC at the milliseconds timescale, 2) measure the effect of mutations deeply impacting global reorganizations highlighting the major role of allosteric coupling of different protein domains to permit its activation, 3) characterize intermediate states of eukaryotic pLGICs upstream activation.

Combined to structural analysis, fluorescence data obtained provide detailed description of conformational intermediates of pLGICs activation and deepen the knowledge of molecular mechanisms determining normal and pathological functioning of these receptors.

Remerciements

Cette thèse est le fruit d'un long travail qui n'aurait pas été le même sans l'implication de nombreuses personnes qui m'ont apporté leur soutien tant sur le plan scientifique que personnel et je tiens à les en remercier de tout cœur ici.

Tout d'abord, je voudrais remercier **Pierre-Jean** de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir fait confiance pour réaliser ce projet. Ton soutien permanent et ta capacité d'écoute tout au long de la thèse m'ont permis de m'épanouir dans ce projet et de surmonter les moments de découragement. J'ai appris à rebondir quand la première direction prise n'est pas la bonne, à me méfier des artefacts, mais aussi à apprécier les petites victoires qui arrivent parfois dans le long parcours de la recherche. Je te remercie aussi pour ta disponibilité lors de nos longues discussions pour l'interprétation des résultats qui ont contribué à forger mon raisonnement scientifique.

Je voudrais ensuite remercier **Anaïs** qui m'a patiemment formé à mon arrivée au laboratoire et qui m'a tout appris sur GLIC et son étude par fluorescence, tant sur le plan pratique que théorique. J'ai beaucoup de chance d'avoir suivi tes pas !

Je remercie **Sophie** pour l'aide enthousiaste que tu m'as apporté à la fin de ma thèse lors de ton stage de master, et je suis très contente de te transmettre le relais pour la suite car je sais le projet entre de bonnes mains !

Cette thèse a été effectuée dans le formidable laboratoire RCN qui a fait de cette thèse une aventure extrêmement enrichissante, joyeuse et jamais ennuyeuse. En particulier, je voudrais remercier **Karima** avant tout pour ton aide inestimable mais aussi pour ta générosité et toutes tes petites attentions qui contribuent beaucoup à la bonne atmosphère du laboratoire. **Marc R** pour tous les pains viennois et les sessions de squash qui auront contrées les revers les plus redoutables de la thèse. **Marie** et **Marc G** pour vos conseils toujours avisés et votre bienveillance qui m'ont grandement aidé à prendre confiance en moi. **Nathalie** et **Laurie** pour les excès de motivation, toutes ces chansons mises dans ma tête mais aussi pour votre gentillesse et votre soutien autant psychologique que calorique surtout lors de la rédaction. **Akos** et **Priyank** pour vos conseils et toutes ces débats nocturnes, *just for the sake*

of argument. Mais aussi **Ana, Adrien, Catherine, Dorota, Grazyna** et **Qimeng** et la team Wolff : **Nico, Célia S, Baptiste, Yanlei** et **Mariano** pour votre expertise, votre soutien, votre sympathie et tout le temps passé ensemble au labo, à la cantine et à l'annexe, ça a été un plaisir de passer ces années avec vous.

Que ce soit à Pasteur, par des collaborations ou en congrès, beaucoup de personnes ont contribué d'une manière ou d'une autre à l'aboutissement de ce travail par leur aide et les discussions qui ont fait avancer mon cheminement scientifique. En particulier, je tiens à remercier **Florian** et **Gaël** pour votre grande aide microscopique, **Alex** l'expert liposomes, **Hugues** pour l'opportunité que tu m'as donné de travailler sur le récepteur sérotonine et **Laetitia** pour tes conseils en VCF et sur le projet tout au long du parcours. Je suis également reconnaissante envers les membres de mon jury qui ont accepté et pris le temps d'examiner mon travail.

L'institut Pasteur est rempli de personnes extraordinaires que j'ai eu la chance de côtoyer pendant cette thèse. Parmi elles je voudrais remercier mon acolyte de thèse, **Célia R** pour ton soutien et tous les moments partagés, tu es une inspiration de femme scientifique enthousiaste et déterminée. **Steph**, merci pour tes encouragements, ta bienveillance et toutes ces discussions tardives garées en double file, je te dois beaucoup ! Je remercie aussi **Morgane, Fred** et toutes les *maskottes* pour les moments partagés au café soleil. Également **Andréas** et **Soham**, mes compères de rédaction et de péripéties administratives, ainsi que tous les résidents de Fernbach qui se sont souciés de mon humeur en particulier ces derniers mois.

Je remercie évidemment ma famille et mes amis qui m'ont supporté dans tous les sens du terme, ces quelques lignes sont bien maigres en comparaison avec ce que vous avez pu m'apporter. Mes parents **Marc** et **Geneviève**, pour leur soutien depuis le début et leur intérêt sans failles pour comprendre mon sujet de thèse. **Camille** et **Baptiste** pour les bouffées d'air si essentielles et les conseils en direction artistique. **Charlotte** pour les sessions yoga-bière, qui auront été le remède anti-stress le plus efficace dernièrement ! Et enfin les plus grenobloises des parisiennes, **Oriane** et **Radhia** ainsi que toute la bande de l'UJF, c'est aussi un peu grâce à vous si je suis arrivée jusque-là !

Pour finir, je tiens à mentionner les organismes qui ont financé ce projet : le Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation d'abord, puis par la suite l'Institut Pasteur et la Fondation pour la Recherche Médicale et je tiens à remercier tous les acteurs et contributeurs enthousiastes et convaincus par l'importance de soutenir la recherche scientifique.

Table des matières

Introduction.....	12
<i>Introduction générale.....</i>	<i>12</i>
La synapse chimique	12
Les récepteurs aux neurotransmetteurs à la synapse	13
Les récepteurs métabotropes	14
Les récepteurs ionotropes.....	14
<i>Les Récepteurs Canaux Pentamériques.....</i>	<i>16</i>
La famille des RCPs.....	16
La grande diversité des RCPs	17
<i>Rôles physiologiques des RCPs et pathologies associées.....</i>	<i>18</i>
Localisation spatio-temporelle.....	18
Rôles physiologiques	19
Pathologies associées.....	20
<i>Fonctionnement des RCPs</i>	<i>22</i>
Le fonctionnement des protéines oligomériques	22
La découverte de l'allostérie	22
Le modèle séquentiel KNF.....	23
Le modèle concerté MWC.....	24
Extension du modèle MWC.....	25
L'électrophysiologie pour l'étude fonctionnelle des RCPs.....	26
Les RCPs des protéines allostériques présentant des états intermédiaires.....	28
L'état désensibilisé	29
L'intermédiaire <i>flipped</i>	30
Les intermédiaires <i>primed</i>	32
Étude du chemin d'activation.....	32
<i>Structure des RCPS : entre homologie et spécificité.....</i>	<i>34</i>
Historique de la résolution structurale des RCPs	34
Essor de la résolution structurale.....	35
Structure générale des RCPs	38
Sélectivité du canal.....	41
<i>Pharmacologie des RCPs</i>	<i>43</i>
Pharmacologie du site orthostérique.....	44
Autres sites allostériques de l'ECD	46
Modulateurs dans le TMD	48
Interaction avec la membrane.....	50
Bloquants du canal.....	51
Prédiction de nouveaux modulateurs	52
<i>Transitions conformationnelle des RCPs</i>	<i>53</i>
Transitions des différents domaines	54
Transitions de l'ECD	54
Réorganisation du site orthostérique dans l'activation	57
TMD dans l'activation et la désensibilisation	58
Perméation du canal.....	60
Mouvements de couplage à l'interface ECD-TMD.....	61
Caractérisation structurale d'intermédiaires de l'activation	62
Un intermédiaire de GLIC localement fermé.....	62
Caractérisation d'un état pré-actif de GLIC.....	63

Vers la caractérisation de familles de conformations.....	64
Conservation des transitions des RCPs.....	64
Conservation des transitions entre procaryotes et eucaryotes.....	64
Altération des transitions par des mutations pathologiques et modulateurs.....	65
<i>L'apport de la fluorescence pour l'étude dynamique des protéines membranaires.....</i>	<i>66</i>
Principes physiques de la fluorescence.....	66
Les outils fluorescents à disposition.....	70
La fluorescence comme rapporteur des changements de conformation.....	71
Une approche classique avec le FRET.....	73
Le quenching induit par le tryptophane.....	74
<i>La VCF, méthode de choix pour l'étude dynamique des canaux ioniques.....</i>	<i>79</i>
La nécessité d'une technique complémentaire au TriQ en système purifié.....	79
Le développement de la VCF.....	80
Utilisation de la VCF pour l'étude des canaux ioniques.....	82
Apports dans la compréhension du fonctionnement des différents canaux ioniques.....	82
Utilisation de la VCF pour l'étude des RCPs.....	83
Application du TriQ en VCF.....	85
Développements techniques.....	86
Considérations sur la résolution temporelle.....	86
Un gap dans la résolution temporelle.....	86
Le retour des études par relaxation.....	88
<i>Problématiques restantes.....</i>	<i>90</i>
Résultats.....	95
<i>Matériels & Méthodes.....</i>	<i>97</i>
Solutions et composés.....	97
Mutagénèse.....	97
GLIC en solution.....	98
Production et purification.....	98
Reconstitution en liposomes.....	98
Mesures à l'équilibre.....	99
Mesures en T-jump.....	100
Électrophysiologie voltage-clamp à deux électrodes.....	100
Injection.....	100
Voltage-clamp électrophysiologie et fluorométrie.....	100
Immunofluorescence sur ovocytes.....	101
Analyses.....	102
<i>Étude de la cinétique de pré-activation de GLIC par T-Jump.....</i>	<i>105</i>
Avant-propos.....	106
Caractérisation de GLIC en protéoliposomes.....	106
Mesure à l'équilibre des changements de conformation de GLIC en liposomes par fluorescence.....	109
Résolution temporelle des changements de conformation de GLIC par T-Jump.....	112
Première phase : relaxation intrinsèque du bimanane.....	114
Deuxième phase : relaxation allostérique de la protéine.....	116
Corrélation entre pH50 et amplitude de relaxation.....	117
Le propofol confirme la nature de la relaxation.....	118
Analyses cinétiques.....	120
Discussion.....	121
<i>Étude de l'effet structural de mutations et modulateurs sur les transitions de GLIC par quenching de la fluorescence.....</i>	<i>127</i>
Avant-propos.....	128
Mouvements concertés de pré-activation, révélés par des mutations allostériques partielles.....	130
Caractérisation des mutations perte de fonction D32E H235Q et E222Q.....	130
Effet des mutations D32E H235Q et E222Q sur la fluorescence.....	132

Effet bidirectionnel du propofol.....	134
Découplage des mouvements.....	136
H235F stabilise un intermédiaire localement fermé.....	136
L246A et L157A présentent des conformations intermédiaires inédites.....	141
Région clé pour la distance inter sous-unité et la stabilité de l'état de repos.....	145
Tentative de détermination de distances pour comparaison avec les simulations.....	149
Comparaison avec des mutations pathologiques des RCPs humains.....	150
Discussion.....	152
<i>Étude des transitions de RCPs eucaryotes par Voltage-clamp fluorométrie.....</i>	<i>158</i>
Description du dispositif de voltage-clamp fluorométrie.....	159
Caractérisation des fluorophores pour l'utilisation en VCF.....	163
La VCF pour l'assignement des structures du 5-HT ₃ R.....	168
La VCF pour l'étude des transitions de GlyR.....	175
Rationnel de la conception de paires Cystéine-Tryptophane.....	175
Description des paires identifiées.....	179
Caractérisation de la paire Q219C-K143W.....	182
Mutations.....	189
Discussion.....	191
Discussion Générale.....	198
Annexes.....	206
<i>Références.....</i>	<i>206</i>
<i>Liste des publications.....</i>	<i>228</i>

Abréviations

5-HT ₃ R	Récepteurs à la sérotonine
AchBP	<i>Acetylcholine Binding Protein</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie par force atomique
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique
ARN	Acide ribonucléique
ASIC	<i>Acid sensing ion channels</i>
ATP	Adénosine triphosphate
CNG	Canaux activés par les nucléotides cycliques
DDM	n-dodécyl-β-D-maltoside
DHA	Acide docosahexanoïque
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
EC50	Concentration efficace médiane
ECD	Domaine extracellulaire
ELIC	<i>Erwinia chrysanthemi ligand gated ion channel</i>
FP	Protéines Fluorescentes
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
GABA	Acide γ-aminobutyrique
GABA _A R	Récepteurs au GABA
GABA _B	Récepteurs métabotropes du GABA
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLIC	<i>Gloeobacter violaceus ligand gated ion channel</i>
GluCl	Récepteurs au glutamate
GlyR	Récepteurs à la glycine
GPCR	Récepteurs couplés aux protéines G
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>
ICD	Domaine intracellulaire
iGluR	Récepteurs ionotropiques au glutamate
KNF	Koshland Némethy Filmer
LC	<i>Locally-closed</i>
LFER	<i>Linear free energy relation</i>
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MES	Acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique
mGluR	Récepteurs métabotropes du glutamate
MTS	méthanethiosulfonate
MTSR	Sulfo rhodamine méthanethiosulfonate
MWC	Monod Wyman Changeux
nAChR	Récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine
NAM	Modulateur allostérique négatif

NMDA	N-methyl-D-aspartate
P2XR	Récepteurs purinergiques
PAM	Modulateur allostérique positif
PBS	Tampon phosphate salin
PCF	Patch-Clamp Fluorométrie
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PE	Phosphatidylethanolamine
PFA	Paraformaldehyde
PG	Phosphatidylglycérol
pH50	Concentration efficace médiane en unité pH
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
POPC	Phosphatidylcholine
RCPs	Récepteurs Canaux Pentamériques
RMN	Résonance Paramagnétique Nucléaire
RPE	Résonance paramagnétique électronique
sBPY	Bodipy sel de Bunte
SCAM	Accessibilité par substitution des cystéines
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
sTeLIC	<i>Endo-symbiont of Tevnia jerichonana Ligand gated ion channel</i>
TAMRA	2-((5(6)-Tetramethyl-rhodamine)carboxylamino)ethyl Methanethiosulfonate
TMD	Domain transmembranaire
TMRM	Tetramethyl-rhodamine-6-maleimide
TriQ	Quenching Induit par le tryptophane
TRP	Canaux thermosensibles
VCF	Voltage-Clamp Fluorométrie
VFD	<i>Venus Flytrap Domain</i>

INTRODUCTION

Introduction

Introduction générale

La synapse chimique

Les cellules, briques élémentaires du vivant sont isolées du milieu extérieur par leur membrane. La différence de concentration ionique des milieux intra et extracellulaires crée un potentiel membranaire de repos qui est maintenu aux alentours de -70 mV grâce à l'activité des ATPases qui pompent le sodium et le potassium contre leur gradient. Les neurones sont les cellules qui, avec les cellules gliales, constituent le système nerveux et font partie des cellules dites excitables. Une perturbation extérieure peut modifier le potentiel membranaire de ces cellules qui peuvent alors être hyperpolarisées ou dépolarisées. L'intégration des différents signaux détermine ensuite la formation de potentiel d'actions. La transmission de cet influx nerveux d'une cellule à l'autre est appelée la communication neuronale et représente la base physiologique des fonctions cognitives.

La synapse chimique est une jonction cellulaire spécialisée qui permet, avec la synapse électrique, cette communication neuronale. Elle est constituée de deux compartiments, d'une part elle comprend le compartiment présynaptique contenant des vésicules chargées en neurotransmetteurs et d'autre part le compartiment postsynaptique qui contient des récepteurs capables de lier ces neurotransmetteurs (Figure 1).

La constitution de la synapse n'est pas figée et la localisation des récepteurs est régulée par des mécanismes constants d'endo-exocytose, par leur diffusion latérale dans la membrane ou encore par les interactions avec des protéines d'échafaudage (M. Dahan et al., 2003). La plasticité synaptique dépend également de la régulation et du recyclage des vésicules contenant les neurotransmetteurs, du trafic des protéines du cytosquelette, des protéines d'adhésion et de manière générale des protéines spécifiques de la densité synaptique (Makino & Malinow, 2009; Schnell et al., 2002).

En quelques millisecondes après l'arrivée d'un potentiel d'action dans le compartiment présynaptique, les récepteurs sensibles au voltage présents à la membrane vont s'activer et engendrer une entrée de calcium dans le bouton synaptique. L'augmentation de la concentration en calcium va déclencher la fusion rapide des vésicules permettant ainsi la

libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Lorsque les neurotransmetteurs se lient spécifiquement aux récepteurs postsynaptiques, des réorganisations intramoléculaires ont lieu et entraînent l'ouverture des canaux associés, permettant un flux ionique passif et ainsi la communication entre deux neurones situés de part et d'autre de la synapse. Le flux ionique va modifier le potentiel membranaire et une hyperpolarisation de la membrane va entraîner une inhibition du neurone postsynaptique alors qu'une dépolarisation entrainera une excitation qui pourra déclencher un potentiel d'action si le potentiel seuil est atteint.

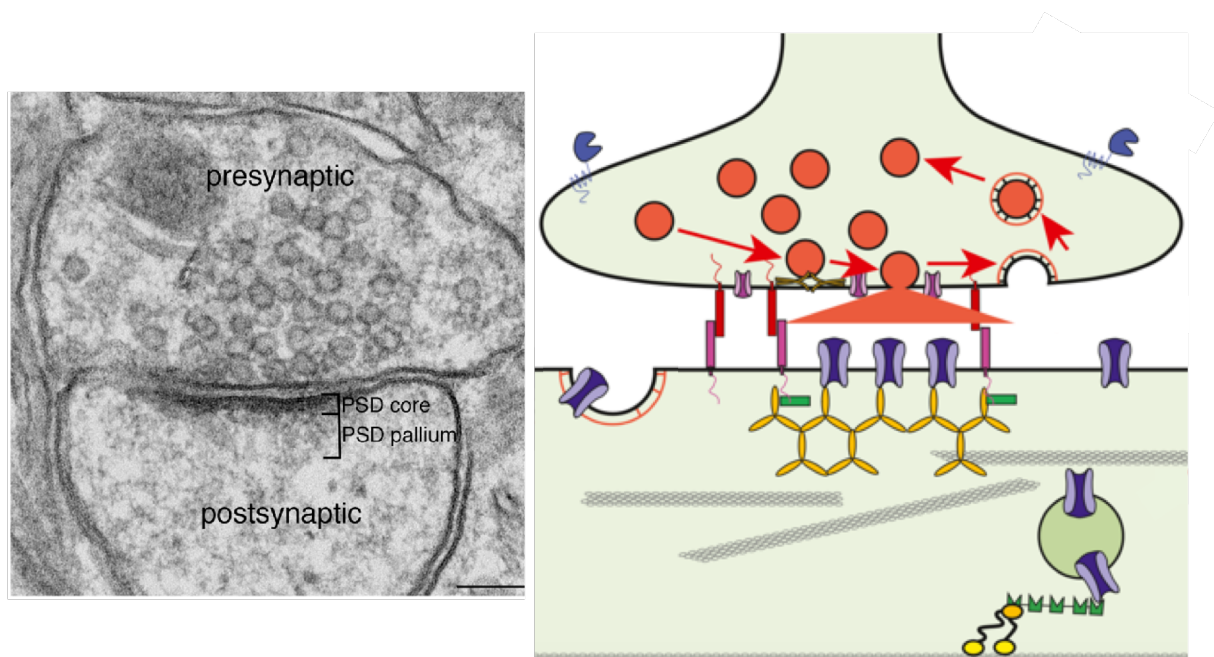


Figure 1. La synapse chimique. À gauche, visualisation par microscopie électronique d'une synapse chimique glutaminergique avec la densité post-synaptique (PSD core et pallium) échelle = 0,1 µm (Dosemeci, Weinberg, Reese, & Tao-Cheng, 2016). À droite, schéma des différents éléments constituant la synapse chimique avec les récepteurs membranaires, les vésicules remplies de neurotransmetteurs, les protéines d'ancrage post-synaptique, les protéines de fusion des vésicules et les protéines permettant le trafic des récepteurs (Choquet & Triller, 2013).

Les récepteurs aux neurotransmetteurs à la synapse

Il existe deux sortes de récepteurs aux neurotransmetteurs, les récepteurs ionotropes qui contiennent un canal ionique et sont impliqués dans la transmission synaptique rapide, et les récepteurs métabotropes qui entraînent l'activation de canaux via une cascade de signalisation.

Les récepteurs métabotropes

On trouve à la synapse des récepteurs métabotropes activés par les différents neurotransmetteurs tels que le glutamate, l'acétylcholine, l'adénosine ou encore l'acide γ -aminobutyrique (GABA). Ils font partis de la superfamille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) et partagent une topologie commune avec classiquement 7 domaines transmembranaires, le site de liaison aux neurotransmetteurs se situe coté extracellulaire et un domaine intracellulaire permet l'activité de régulation via l'interaction avec des protéines G (Y. Huang & Thathiah, 2015). Les récepteurs au glutamate (mGluR) et au GABA (GABA_BR) font partie de la classe C des GPCR et leur domaine extracellulaire est constitué d'un domaine Venus Flytrap (VFD) qui lie l'agoniste. Les mGluR contiennent aussi un domaine riche en cystéines qui fait le lien entre le VFD et le domaine transmembranaire (Niswender & Conn, 2010).

Les récepteurs ionotropes

Les récepteurs ionotropes peuvent être classés en trois superfamilles, selon leur oligomérisation trimérique, tetramérique ou pentamérique (Figure 2). Les récepteurs trimériques activés par l'adénosine triphosphate (ATP) sont aussi appelés récepteurs purinergiques (P2XR). Ils sont formés de trois sous-unités qui contiennent chacune deux hélices transmembranaires et lient l'ATP à l'interface entre sous-unités dans le domaine extracellulaire. Sept sous-types sont caractérisés chez les mammifères, formant généralement des homotrimères. Plusieurs d'entre eux ont été caractérisés structurellement, et présentent un large réarrangement des hélices transmembranaires entre les conformations liées ou non à l'ATP (Kasuya et al., 2017). Fonctionnellement ils diffèrent notamment par leur réponse temporelle à l'ATP selon leur propension à désensibiliser. Le rôle des P2XR a été identifié dans la douleur neuropathique, les processus de l'audition, ou encore dans les fonctions cardiaques. La régulation de ces récepteurs est affectée lors de réponses immunitaires ce qui fait des P2XR une cible thérapeutique pour différentes pathologies incluant une l'inflammation (Schmid & Evans, 2018).

La classe des récepteurs tétramériques est constituée de récepteurs au Glutamate (iGluR). Historiquement classés selon leur agoniste synthétique acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique (AMPA), N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et Kaïnate, ce sont les récepteurs majoritaires de la transmission excitatrice dans le cerveau humain. Chez les

humains on retrouve quatre gènes codants pour les récepteurs AMPA GluA1-4; cinq Kainate GluK1-5; sept NMDA GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B; et deux récepteurs delta GluD1 et GluD2 (Collingridge, Olsen, Peters, & Spedding, 2009). Chacune des sous unités est constituée d'un domaine N-terminal extracellulaire, d'un domaine de liaison à l'agoniste d'un domaine intracellulaire C-terminal et le domaine transmembranaire est composé de 3 hélices et un segment non traversant qui forment le canal (Herguedas et al., 2016). Le tétramère est en général un hétéromère, formé par un dimère de dimère où les paires de dimères sont échangées entre le domaine extracellulaire et transmembranaire (*domain swapping*). Les récepteurs AMPA et NMDA sont impliqués dans la plasticité synaptique et avec les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR) ils ont un rôle déterminant dans la formation de potentialisation et dépression à long terme (LTP et LTD) et donc dans les fonctions de mémorisation et d'apprentissage (Hunt & Castillo, 2007).

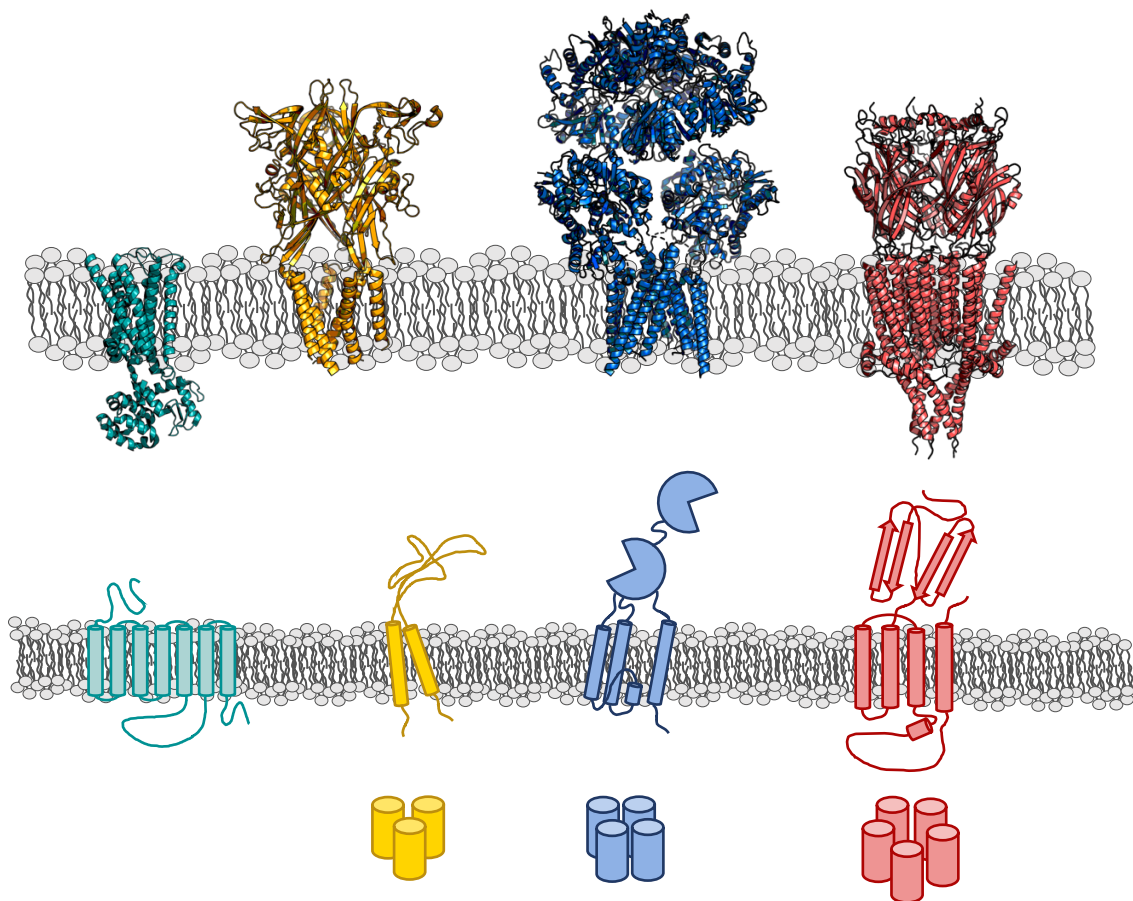


Figure 2. Topologie des récepteurs aux neurotransmetteurs. Exemples de structure des récepteurs aux neurotransmetteurs, topologies d'un monomère, et arrangements oligomériques des superfamilles de récepteurs ionotropes. Sont représentés le récepteur muscarinique à l'acétylcholine M3 (4DAJ) ; le récepteur P2X7 (5XW6) ; le récepteur AMPA GluA2/3 (5IDE) et le récepteur 5-HT_{3A} (6HIS).

La classe des récepteurs pentamériques comprends 4 grandes familles selon le neurotransmetteur reconnu. Chaque sous-unité est composée de trois domaines : un large domaine extracellulaire (ECD) en N-terminal formé par un sandwich de deux feuillets beta et où se trouve le site de liaison à l'agoniste ; un domaine transmembranaire (TMD) constitué de quatre hélices et un domaine intracellulaire (ICD) entre les hélices 3 et 4. Leurs fonctions physiologiques sont variées et sont décrites en détails dans la partie suivante.

Les Récepteurs Canaux Pentamériques

La famille des RCPs

Chez les mammifères, les récepteurs canaux pentamériques (RCPs) comprennent les récepteurs à la Glycine (GlyR), au GABA ($GABA_A$ R), à la sérotonine ($5-HT_3$ R), à l'acétylcholine (nAChR) appelés aussi récepteurs nicotiniques et enfin un récepteur au zinc (ZAC). Chez certains invertébrés d'autres RCPs sont également présents et sont activés en particulier par le glutamate (GluCl). Chez des mollusques et annélides, on retrouve une version tronquée des nAChR appelée AChBP qui comporte seulement le domaine extracellulaire et qui est capable de lier l'acétylcholine. En 2005, une étude génomique a révélé l'existence de RCPs chez les archées et les bactéries, orthologues à ceux connus chez les animaux (métazoaires) (Tasneem, Iyer, Jakobsson, & Aravind, 2005). Une trentaine de candidats a été découverte, tous avec une séquence prédisant une même organisation structurale avec un domaine extracellulaire et quatre segments transmembranaires avec cependant un domaine supplémentaire pour certains d'entre eux en N-terminal. Parmi ces homologues bactériens, trois ont été étudiés en détails : GLIC provenant de la cyanobactérie *Gloeobacter violaceus* qui est activé par les protons (Bocquet et al., 2007); ELIC chez la bactérie gram négative *Erwinia chrysanthemi* (récemment re-qualifiée en *Dickeya dadantii*), activé par le GABA et la cystéamine et plus récemment sTeLIC qui provient d'un endosymbiote du ver tubicole géant *Tevnia jerichonana* et qui est activé à pH alcalin (Hu, Nemezc, et al., 2018). Bien que la fonction physiologique de ces récepteurs chez les procaryotes reste inconnue, leur découverte a permis une grande avancée du point de vue structurale pour les RCPs et les recherches récentes sur les récepteurs eucaryotes continuent de confirmer la pertinence des récepteurs procaryotes comme modèle pour l'étude des RCPs.

La grande diversité des RCPs

Certains RCPs sont cationiques comme les nAChR, 5-HT₃R et GLIC alors que d'autres sont perméables aux anions comme c'est le cas des GlyR, GABA_AR et de GluCl. Il existe différents types de sous-unités pour les différents récepteurs. Chez l'Humain, pour les 5-HT₃R et GlyR on trouve 5 sous-unités différentes de A à E pour le récepteur à la sérotonine et α 1-4 ; β pour le GlyR. Pour les GABA_AR on dénombre 17 sous-unités α 1-6 ; β 1-3 ; γ 1-3 ; ρ 1-3 ; δ ; ϵ ; π et θ ainsi que 19 pour les nAChR α 1-10 ; β 1-4 ; γ ; δ et ϵ . (Figure 3).

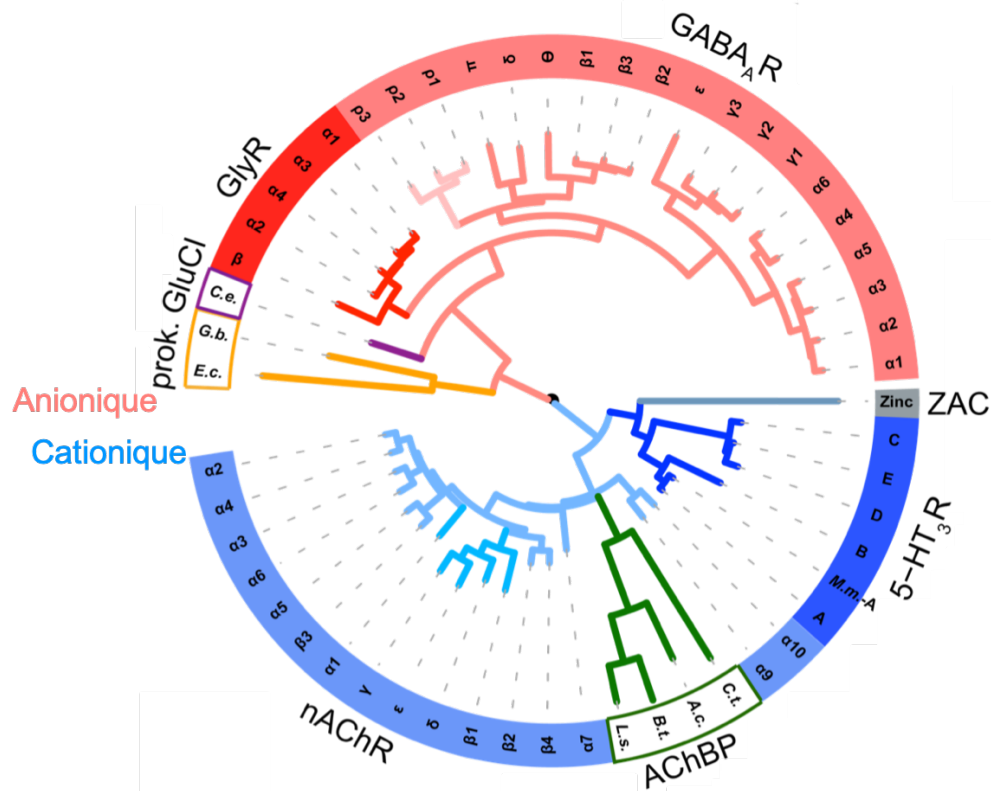


Figure 3. Arbre phylogénique des RCPs Phylogénie des différents sous-types des RCPs humains avec la distinction de quelques récepteurs non-humains dont la structure a été résolues (Adapté de Nemezc, Prevost, Menny, & Corringier, 2016).

On retrouve certaines sous-unités sous forme d'homopentamère, c'est le cas par exemple du Glycine α 1 ou encore du GABA β 3. Mais une grande majorité des RCPs sont retrouvés sous forme d'hétéropentamères par exemple le GABA α 1 β 3 γ 2, le 5-HT_{3AB} ou encore le nAChR α 4 β 2 α 5 (Dent, 2010). Le récepteur nicotinique musculaire qui a été largement étudié est lui composé de deux sous-unités α et quatre non- α et donne pour la forme adulte α 2 β 1 γ δ . Le grand nombre de sous-unités donne lieu à un très grand nombre de combinaisons possibles avec différentes stœchiométries qui conduisent à la formation de RCPs avec des propriétés

différentes en termes d'activation, désensibilisation et conductance et ces stœchiométries confèrent des propriétés pharmacologiques distinctes.

Rôles physiologiques des RCPs et pathologies associées

Localisation spatio-temporelle

Les RCPs sont exprimés de manière hétérogène dans le système nerveux, à la fois spatialement et temporellement selon le type de récepteur et sa composition oligomérique.

L'expression est variable dans les différentes régions du système nerveux central et périphérique et des analyses des niveaux d'expression de protéine ou de transcription par quantification des ARN messagers permet de cartographier les niveaux d'expressions dans les différentes régions. À titre d'exemple, le récepteur à la Glycine est davantage exprimé dans la moelle épinière et le tronc cérébral alors que l'inhibition dans le cortex est plutôt assurée par les GABA_AR (Malosio, Marqueze-, Pouey, Kuhse, & Betz, 1991). Les récepteurs à la Glycine homomériques $\alpha 2$ sont davantage exprimés au cours du développement embryonnaire et leur population décroît après la naissance pour être remplacée par les hétéromères $\alpha\beta$ (Lynch, 2009). Cependant l'expression du GlyR $\alpha 2$ persiste dans l'hippocampe et la rétine à l'âge adulte (Betz & Laube, 2006). Le récepteur à la sérotonine 5-HT₃R est exprimé dans le système nerveux central et le tronc cérébral, plus particulièrement le type 5-HT_{3A}R est exprimé chez la souris dans le bulbe olfactif, le cortex cérébral, l'hippocampe et l'amygdale mais est absent du cervelet (Koyama, Kondo, & Shimada, 2017). L'expression de l'hétéromère 5-HT_{3AB}R semble être cantonné au système nerveux périphérique (Thompson & Lummis, 2006).

L'expression des RCPs varie aussi selon le type de cellules neuronales et on trouve aussi des RCPs dans les cellules épithéliales, immunitaires ou musculaires par exemple les récepteurs musculaires nicotiques $\alpha 1_2\beta 1\delta\gamma$ et $\alpha 1_2\beta 1\delta\epsilon$ s'expriment spécifiquement à la jonction neuromusculaire (Albuquerque, Pereira, Alkondon, & Rogers, 2009).

À l'échelle cellulaire, on retrouve certains RCPs localisés à la membrane postsynaptique mais ils sont aussi présents à la membrane présynaptique et dans les espaces extra synaptiques des cellules neuronales et musculaires. Les RCPs homomériques GlyR $\alpha 1$ et $\alpha 3$ sont davantage exprimés en dehors de la synapse alors que les hétéromères $\alpha\beta$ sont eux localisés à la membrane post-synaptique grâce à la Géphyrine une protéine d'ancrage qui fait

le lien avec le cytosquelette et interagit avec la boucle intracellulaire des sous-unités GlyR β et GABA_AR $\alpha 2$ (Fritschy, Harvey, & Schwarz, 2008; Sola et al., 2004).

La régulation de la plasticité synaptique peut se faire via des interactions avec des protéines d'échafaudage, de trafic ou des chaperonnes. Ainsi les protéines Lynx-1 et 2 régulent le trafic de certains nAChR du réticulum à la membrane (George et al., 2017) et NaCHO et Ric-3 favorisent le repliement et l'adressage à la membrane de nAChR $\alpha 7$ (Halevi, McKay, & Palfreyman, 2002; Matta et al., 2017). Ces interactions elles-mêmes peuvent être régulées par la modifications post-traductionnelles des RCPs comme c'est le cas pour l'interaction GlyR-Géphyrine qui est dépendante de la phosphorylation par la protéine Kinase C (Specht et al., 2011). Il a été montré que la phosphorylation pouvait induire des changements de conformation sur GlyR (L. Han, Talwar, Wang, Shan, & Lynch, 2013) et pouvait modifier la sensibilité des GABA_AR pour les benzodiazépines et celle des nAChR pour l' α -bungarotoxine (Talwar & Lynch, 2014). Enfin, les RCPs des mammifères présentent des sites de glycosylation dans leur partie extracellulaire qui pourraient moduler l'activation et la désensibilisation des RCPs (Scott & Panin, 2014).

Rôles physiologiques

Chez les bactéries gram négatives, les RCPs sont retrouvés au niveau de la membrane interne et pourraient avoir un rôle dans le maintien de l'homéostasie. Une hypothèse a été émise pour ELIC qui serait lié à la dégradation d'acides aminés des racines de plantes (Zimmermann & Dutzler, 2011). *Gloeobacter violaceus* qui exprime GLIC est connue pour son absence de thylakoïdes qui est inhabituelle chez les cyanobactéries. On retrouve ses systèmes photosynthétiques et respiratoires à la membrane plasmique mais dans des domaines membranaires spécialisés (Rexroth et al., 2011). La photosynthèse chez cette cyanobactérie primitive entraîne l'accumulation de protons dans le périplasme et une hypothèse de la fonction de GLIC pourrait être de contribuer à l'adaptation aux changements de pH. Une autre possibilité serait une fonction particulière via un agoniste de GLIC qui n'aurait pas encore été découvert.

Dans le système nerveux, les récepteurs extra-synaptiques jouent le rôle de neuro-modulateurs par un contrôle constant de l'activité cellulaire. Ceux présents à la membrane postsynaptique régulent la transmission synaptique et donc la communication neuronale

selon leur nature et leur nombre. Les RCPs anioniques GABA_AR et GlyR vont généralement être inhibiteur en hyperpolarisant la membrane via une entrée d'ions chlore, sauf dans certaines situations particulières où la concentration intracellulaire en ions chlores est significativement augmentée. Bien que le glutamate soit le principal neurotransmetteur exciteur dans le cerveau, l'activation des nAChR et 5-HT₃R postsynaptiques peut créer une dépolarisation induite par un influx de sodium et de calcium (Wu, Cheng, Jiang, Melcher, & Xu, 2015). L'activation de 5-HT₃R présynaptiques a aussi un effet exciteur via l'entrée de calcium qui module la libération vésiculaire de neurotransmetteurs (Fink & Gothert, 2007).

Les RCPs ont un rôle dans un grand nombre de processus physiologiques, dépendant de leur nature et de leur localisation. Globalement, les RCPs ont à la fois un rôle sensoriel et moteur, ils sont impliqués dans la gestion de la douleur et de l'anxiété, le sommeil, la mémoire et le système de récompense mais aussi dans les fonctions autonomes centrales et périphériques, la tonicité musculaire, la coordination motrice ou le rythme respiratoire (Burgos, Yevenes, & Aguayo, 2016; Nemezc et al., 2016; Wu et al., 2015).

Pathologies associées

Du fait de leurs rôles physiologiques variés, de nombreuses canalopathies sont associées aux mutations des RCPs. Ces mutations peuvent être des délétions, insertions ou encore des polymorphismes liés à un seul nucléotide (SNP). Le récepteur muté peut voir sa fonction altérée par exemple par un changement d'affinité pour son agoniste, de sa conductance et peuvent affecter ses réorganisations conformationnelles. Une mutation peut également entraîner un défaut de repliement, d'expression ou de régulation du trafic du récepteur dans la cellule. Les RCPs sont également impliqués dans différentes maladies psychiatriques et neurodégénératives sans que des mutations particulières soient forcément identifiées.

Sur les GlyR, la pathologie engendrée par des mutations la plus largement décrite est l'Hyperékplexie (Bode & Lynch, 2014). Cette pathologie est caractérisée par des sursauts réflexes exagérés et une rigidité musculaire en réponse à un stimuli tactile au sonore inattendu. La maladie peut être récessive ou dominante, et certains symptômes peuvent parfois être réduits à l'âge adulte via des mécanismes de compensations par d'autres RCPs (Schaefer, Vogel, & Villmann, 2012). Les mutations peuvent conduire à des récepteurs qui

présentent une activation spontanée ou bien au contraire qui présentent une altération de leur capacité à être activé. La relation entre l'effet fonctionnel de la mutation et les symptômes du patient n'est pas toujours bien établie. Il semble que l'Hyperekplexie soit le résultat d'une perturbation du système d'inhibition glycinergique, quelle que soit la nature de cette perturbation.

La mutation des GABA_AR provoque des syndromes épileptiques qui peuvent varier en sévérité (Hirose, 2014). Une étude récente s'intéresse à la localisation des mutations dans les régions importantes pour la fonction du récepteur et suggère une relation structure-fonction pour expliquer l'effet des mutations (Hernandez & Macdonald, 2019a). Les benzodiazépines constituent une classe de molécule utilisée entre autre pour traiter l'épilepsie, et les GABA_AR sont également une cible thérapeutique pour la régulation des circuits de l'inhibition dans la schizophrénie, l'autisme ou encore de la dépression (Rudolph & Möhler, 2014).

Le récepteur 5-HT₃ est lui impliqué dans les troubles de la dépression (D. Gupta, Prabhakar, & Radhakrishnan, 2016). Il constitue une cible thérapeutique pour les antidépresseurs mais il est aussi la cible de molécules antiémétiques utilisées par exemple dans le cadre du traitement des effets des chimiothérapies.

Des mutations sur les nAChR musculaires entraînent entre autres des myasthénies congénitales (Shen, Fukuda, Ohno, Sine, & Engel, 2008). Certaines mutations des nAChR peuvent aussi engendrer des maladies psychiatriques comme cela a été montré pour le nAChR $\alpha 7$ qui auraient un lien avec la schizophrénie (Sinkus et al., 2015). Certaines mutations seraient aussi en lien avec les syndromes du spectre autistique (Dineley, Pandya, & Yakel, 2015) et le sous-type de nAChR $\alpha 7\beta 2$ a été identifié pour avoir une affinité pour les peptides amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (Liu et al., 2009). Un SNP sur la sous-unité $\alpha 5$ des nAChR a été démontré comme donnant un risque accru pour le cancer du poumon, il est également lié à un plus fort risque pour l'addiction à la nicotine (Saccone et al., 2009). Le récepteur nAChR $\alpha 4\beta 2$ quant à lui est responsable d'épilepsies du lobe frontal (Rodrigues-Pinguet, 2005).

Globalement, le dysfonctionnement des RCPs est une source de nombreuses pathologies et par conséquent, ces récepteurs sont une cible thérapeutique majeure par exemple pour le traitement des dépendances, les maladies psychiatriques ou neurodégénératives.

Fonctionnement des RCPs

Le fonctionnement des protéines oligomériques

La découverte de l'allostérie

La compréhension du fonctionnement des protéines oligomériques a largement évolué avec les études sur l'hémoglobine. En 1903, l'observation de la fonction de saturation de cette protéine par le dioxygène montre qu'elle ne correspond pas à un modèle enzymatique classique comme celui décrit par Michaelis et Menten mais présente une forme sigmoïdale avec une affinité apparente pour l'oxygène qui augmente après la fixation d'une première molécule (Figure 4). L'équation de Hill est alors proposée pour décrire les résultats expérimentaux (Hill, 1910) et plusieurs modèles vont suivre pour exprimer le lien entre l'affinité pour le ligand et l'interaction entre les sous-unités de l'oligomère. 50 ans plus tard, la résolution de la structure de l'hémoglobine va complexifier le problème puisqu'elle montre que les hèmes qui lient l'oxygène sont distants les uns des autres et l'on peut donc exclure l'hypothèse d'une interaction directe entre eux pour expliquer la coopérativité observée expérimentalement (Perutz et al., 1960). En parallèle des études sur l'hémoglobine, des mécanismes d'inhibition d'enzymes par des substrats non analogues stériquement sont également observés et suggèrent que le site de liaison n'est pas le même pour le ligand et l'inhibiteur (J. P. Changeux, 1961). De ce constat, va être suggéré la notion d'inhibition allostérique qui sera étendue par la suite aux mécanismes de transitions allostériques qui sont alors définis par un changement de conformation dû à la liaison d'un effecteur qui va réguler l'activité de la protéine, sur un site différent du site actif (Monod, Changeux, & Jacob, 1963; Monod & Jacob, 1961).

À partir de ces découvertes, deux modèles thermodynamiques qui s'opposent conceptuellement ont été développés simultanément dans la deuxième partie des années 60 pour appréhender le fonctionnement coopératif des protéines oligomériques et le lien entre liaison et fonction.

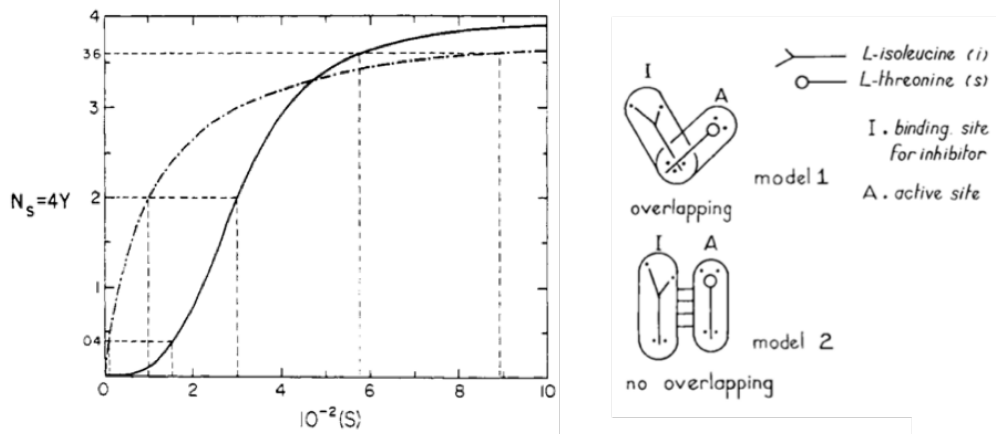


Figure 4. Coopérativité et allostérie. À gauche, exemple de courbes de saturation avec différentes coopérativités selon un modèle sigmoïde (trait plein) ou de type Mickaelis et Menten (pointillé) avec (S) la concentration en substrat et N_s le nombre de molécule liées par tétramère de protéine (D. E Koshland, Nemethy, & Filmer, 1966). À droite, illustration de site de liaison sur la Thréonine désaminase pour des ligands non équivalent stériquement (J. P. Changeux, 1961).

Le modèle séquentiel KNF

Le modèle séquentiel (appelé aussi *induced-fit* ou KNF du nom des auteurs) part du principe que c'est la liaison de l'agoniste qui induit un changement de conformation (D. E Koshland et al., 1966). La liaison d'une molécule sur une sous-unité induit alors un changement de la conformation tertiaire de cette sous-unité ce qui modifie les interactions avec les sous-unités voisines et peut favoriser ou défavoriser la liaison d'une seconde molécule sur la sous-unité adjacente. Ce modèle s'ajuste aux données expérimentales de l'hémoglobine avec seulement l'utilisation de deux paramètres $S_{0.5}$ (concentration en ligand pour avoir la moitié des sites occupés) et R_s (ratio $S_{0.9}/S_{0.1}$). Ce modèle peut également être approprié pour expliquer des systèmes qui présentent une coopérativité négative qui sont largement représentés dans les systèmes biologiques (Daniel E. Koshland & Hamadani, 2002).

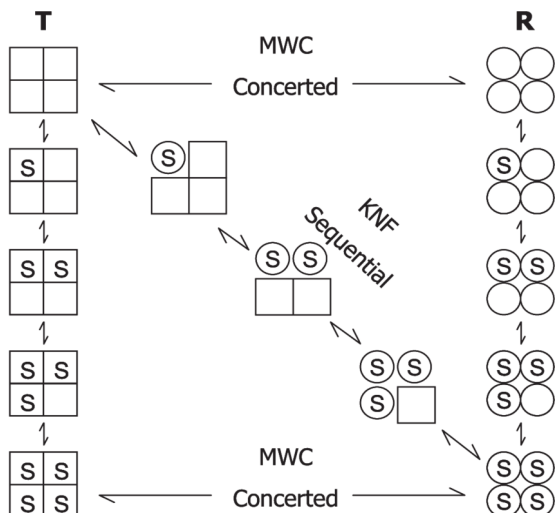


Figure 5. Modèles KNF & MWC. D'après le modèle MWC, il est possible de passer d'un tétramère à l'état de repos T à celui dans l'état actif R sans présence de ligand et la transition se fait de manière concertée (première ligne). Le modèle KNF prévoit lui que chaque sous-unité du tétramère passe dans un état actif lorsque l'agoniste S est lié, pour atteindre l'état actif final (diagonale). Schéma tiré de (Perrella & Russo, 2006).

Le modèle concerté MWC

Un modèle alternatif publié un an auparavant est le modèle concerté (appelé aussi symétrique ou MWC) qui émet deux assumptions qui réduisent le nombre d'états possibles en imposant une symétrie conservée et une réorganisation quaternaire et non pas tertiaire de la protéine (Figure 5). Dans ce modèle, les différents états préexistent avec différentes affinités pour le ligand et sont plus ou moins peuplés selon la concentration en agoniste (Monod, Wyman, & Changeux, 1965). Les systèmes allostériques sont définis comme étant des oligomères pour lesquels des effets hétérotropiques ou homotropiques (selon la nature du ligand) altèrent la structure quaternaire de la protéine. Les effets homotropiques sont toujours coopératifs alors que les effets hétérotropiques peuvent également être négatifs. Le modèle MWC implique que

- L'oligomère est formé par symétrie de protomères donc la conformation dépend des interactions avec les protomères voisins.
- Au moins deux états de l'oligomère existent et la symétrie est conservée entre les protomères pendant la transition entre ces états.
- La transition va modifier l'affinité des sites de liaisons des différents protomères

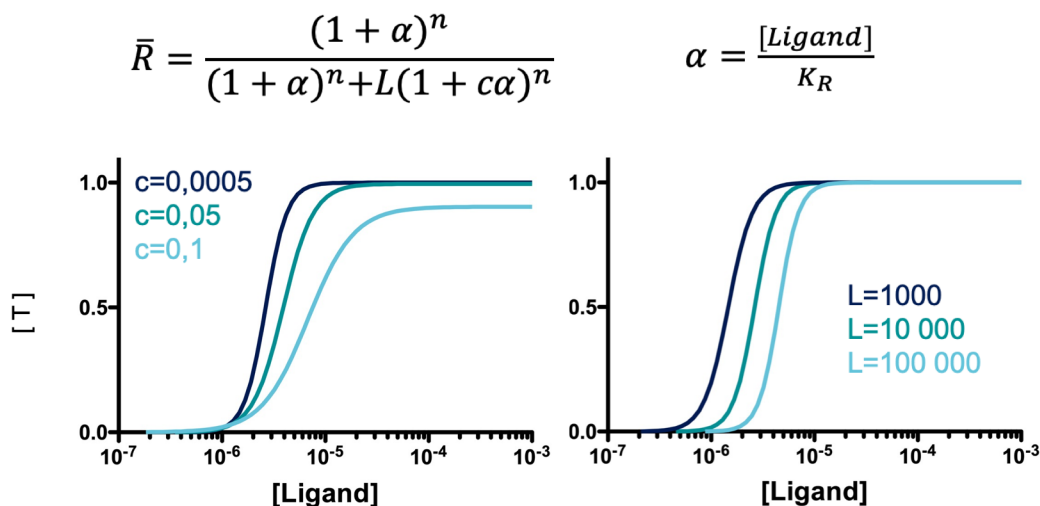


Figure 6. Équations et Coopérativité dans le modèle MWC à 2 états. Équation de la population de l'état R en fonction du nombre de sous-unité, du coefficient d'isomérisation L et du rapport des constantes d'affinités c. Exemple de courbes de population de l'état actif pour un modèle à deux états en fonction de la concentration en ligand avec $K_R=5 \cdot 10^{-7}$ M et $n=5$. À gauche L est fixé à 10 000 et à droite $c = 0,0005$. On observe l'influence de L et c sur la coopérativité dans la courbe de saturation de la population de l'état T.

Trois paramètres sont utilisés pour décrire les équilibres entre deux états R et T et permettent de calculer les populations à l'équilibre de chaque état et la fonction de saturation selon la concentration en ligand :

- L est la constante d'équilibre entre les deux états ou constante d'isomérisation T/R
- c est le ratio des constantes de dissociation du ligand K_R/K_T
- n est le nombre de molécules de ligand

La coopérativité est dépendante des valeurs de L et c et dans le cas représenté ici, la coopérativité est plus importante lorsque L est grand (l'état T est favorisé) et lorsque c est petit (le ligand s'associe plus facilement à l'état T) (Figure 6). Ce modèle peut être complexifié en rajoutant des états ou des ligands qui auront un effet activateur ou inhibiteur et la population de chaque état peut être calculé en fonction de la concentration en ligand (Figure 7).

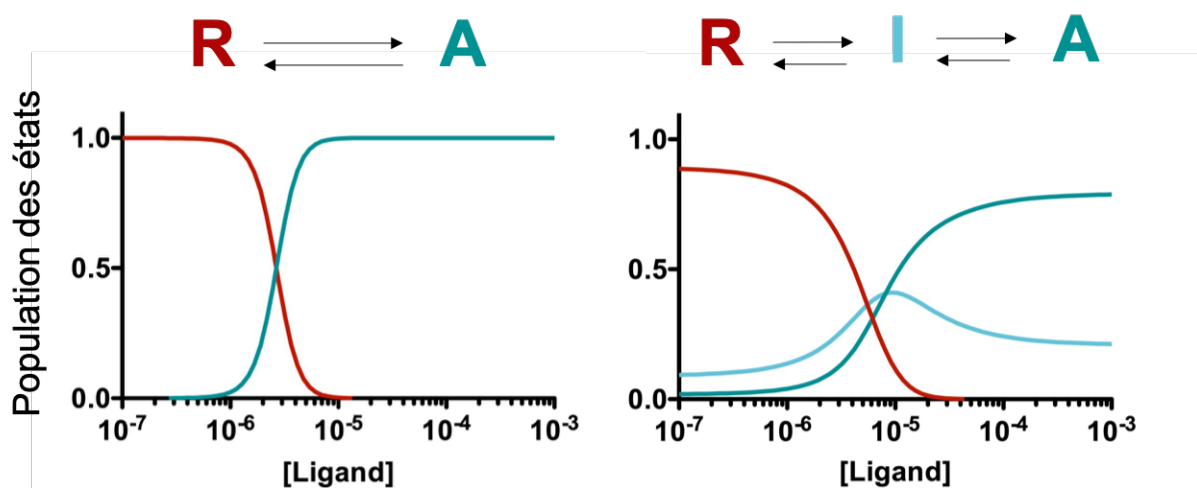


Figure 7. Modèles MWC à 2 et 3 états. Population des différents états en fonction de la concentration en ligand avec pour 2 états : $L_R = 10\ 000$; $c_R = 5^{E-4}$; $K_A = 5^{E-7}$; $K_R = 1^{E-3}$ et pour 3 états : $L_R = 50$; $L_I = 5$; $c_R = 0,0167$; $c_I = 0,556$; $K_A = 5^{E-6}$; $K_I = 9^{E-6}$; $K_R = 3^{E-4}$.

Extension du modèle MWC

Depuis l'énonciation du modèle MWC, l'essor de la biologie structurale et l'augmentation du nombre de systèmes biologiques étudiés ont apporté un certain nombre d'exceptions aux postulats stricts imposés par le modèle et ont approfondi la compréhension fine des systèmes allostériques (Figure 8). L'implication de domaines rigides mais aussi de régions plus flexibles voire de subtiles perturbations entropiques sont nécessaires pour rendre compte des différents effets allostériques au sein de protéines qui ne sont pas forcément

oligomériques (Cui & Karplus, 2008). Le concept de paysage énergétique largement utilisé pour le repliement des protéines peut aussi être appliqué pour étudier les transitions allostériques (Frauenfelder, Sligar, & Wolynes, 1991; Motlagh, Wrabl, Li, & Hilser, 2014). En plus d'être observé sous l'angle thermodynamique avec par exemple une modification d'affinité pour le ligand, les transitions allostériques sont alors étudiées en terme de dynamique conformationnelle (Guo & Zhou, 2016).

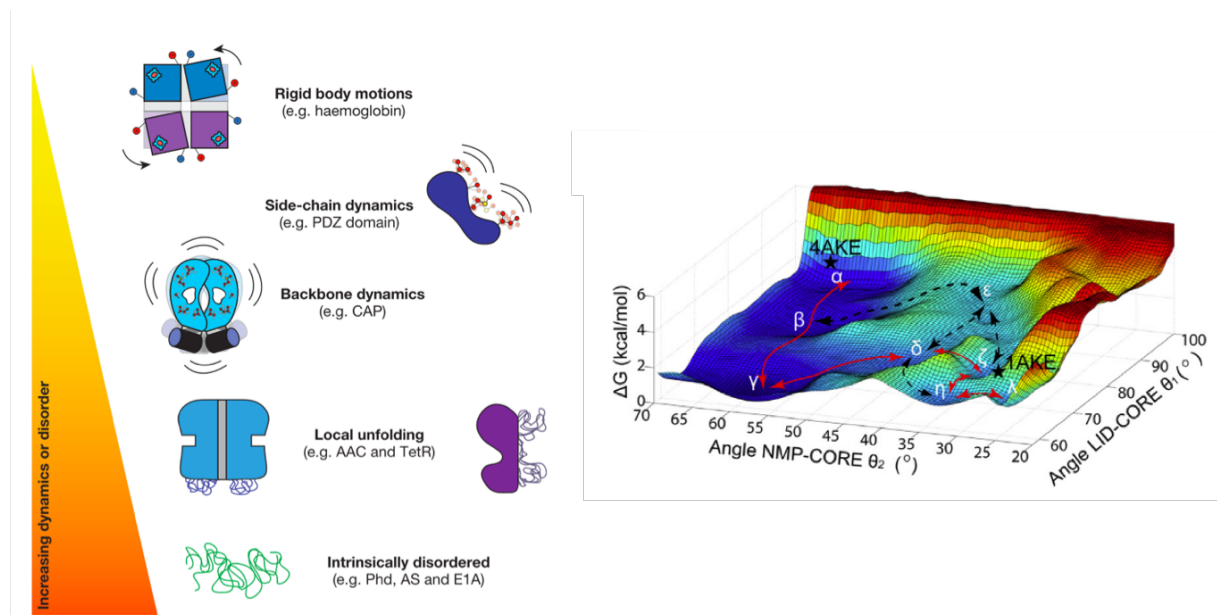


Figure 8. Allostérie dynamique et paysages conformationnels. On retrouve des systèmes allostériques qui sont dynamiques à différentes échelles, avec des mouvements des parties rigides, des chaînes latérales, du squelette mais aussi avec des dépliements locaux et certains systèmes peuvent être intrinsèquement désordonnés (Motlagh et al., 2014). À droite, exemple de paysage énergétique des transitions conformationnelles de l'Adénylate Kinase avec l'énergie libre calculée en fonction de l'orientation de ces domaines (Li, Liu, & Ji, 2015).

L'électrophysiologie pour l'étude fonctionnelle des RCPs

Pour étudier la fonction des RCPs, on peut enregistrer le flux ionique traversant les canaux exprimés à la membrane de cellules selon deux approches : Patch ou voltage-clamp. Les canaux étudiés sont exprimés à la membrane par injection d'ADN plasmidique (ou d'ARN) ou par transfection. Le voltage-clamp se fait généralement sur des ovocytes de xénopes qui a l'avantage d'être un système biologique très robuste alors que le patch apporte une plus grande précision notamment cinétique. Le principe du voltage-clamp est de déterminer un potentiel à la membrane, qui est maintenu par une électrode injectant du courant. Le courant qui passe à travers les canaux est mesuré indirectement en connaissant la quantité de courant injecté pour compenser la différence de potentiel enregistré à la membrane (Figure 9). À partir

des enregistrements du courant évoqué par différentes concentrations d'agoniste, on peut construire une courbe dose-réponse qu'il est possible d'ajuster avec une équation de Hill (voir méthodes). On peut ainsi extraire la valeur d' EC_{50} qui est la concentration en agoniste pour laquelle la moitié de la réponse est observée ; et la valeur du coefficient de Hill n_H qui donne une information sur la coopérativité du processus d'activation.

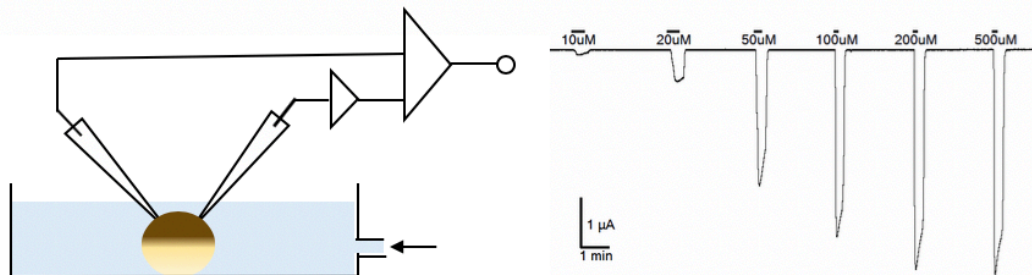


Figure 9. Voltage-clamp à deux électrodes. À gauche, schéma d'un montage d'électrophysiologie voltage-clamp à deux électrodes sur ovocyte de xénope. À droite, exemple de courants évoqués par des applications de glycine à différentes concentrations sur GlyR $\alpha 1$ exprimé en ovocyte de xénope.

Pour le Patch-clamp, différentes configurations existent selon les informations recherchées. En configuration cellule entière (*whole-cell*) on observe une large population de récepteurs, comme en voltage-clamp. Les configurations cellule attachée (*cell-attached*), *outside-out* et *Inside-out* permettent de regarder une population réduite de canaux et rend possible les enregistrements en canal unique qui permettent de mesurer la probabilité d'ouverture des récepteurs (Figure 10). Les développements technologiques dans la fin des années 70 de ces techniques de patch-clamp ont permis pour la première fois la mesure de récepteurs nicotiques musculaires en canal unique (Neher & Sakmann, 1976). Les différentes approches électrophysiologiques ont donc servi de bases pour le développement des théories cinétiques et thermodynamiques des RCPs. Sur un tracé électrophysiologique caractéristique, on peut observer une phase d'activation en présence d'agoniste, puis une phase de désensibilisation qui comporte souvent deux phases, une rapide et une lente.

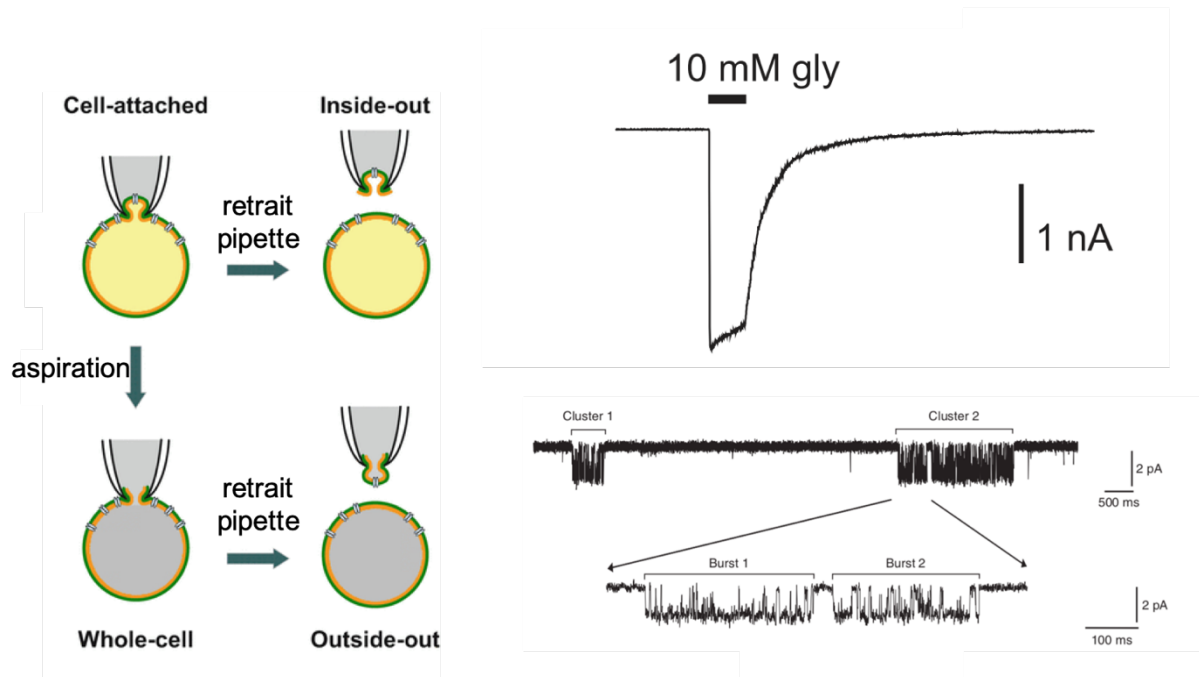


Figure 10. Technique de Patch-clamp. À gauche, les différentes configurations de patch (Jue, 2017). À droite, exemple de réponse obtenue en configuration outside-out sur GlyR et en canal unique sur le GABA_AR en présence de 1 mM de Gaba (Mortensen & Smart, 2007; Wulf & Pless, 2018). On voit sur l'enregistrement de GlyR la phase d'activation puis celle de désensibilisation en présence d'agoniste et enfin la phase de désactivation.

Les RCPs des protéines allostériques présentant des états intermédiaires

Le modèle MWC mentionnait déjà la possibilité de phénomènes allostériques pour la transmission de signaux au niveau membranaire et le modèle a été rapidement appliqué aux RCPs (Karlin, 1967), avant même de découvrir la nature oligomérique de ces récepteurs (Cartaud, Benedetti, Cohen, Meunier, & Changeux, 1973). Au fur et à mesure des avancées sur la compréhension notamment du récepteur nicotinique certains concepts ont aussi été réévalués comme la symétrie seulement partiellement conservée du récepteur musculaire qui est un hétéromère (Lindstrom, Walter, & Einarson, 1979). La transduction du signal par les RCPs est alors décrite par une transition concertée et coopérative d'un état silencieux au repos (canal fermé) vers un état actif. Cet état actif est stabilisé par la présence d'agoniste et les modulateurs pharmacologiques stabilisent préférentiellement un état ou l'autre selon leurs propriétés (J. Changeux & Edelstein, 1998).

Une des implications de la théorie MWC qui n'est pas prédit par le modèle KNF est la possibilité d'observer un récepteur dans l'état actif en absence de ligand. Cet évènement est très rare et a une très faible probabilité d'être observé dans la gamme de temps d'une expérience de single-channel. De tels enregistrements ont pourtant pu être réalisés sur des

récepteurs mutants du nicotinique neuromusculaire pour avoir un gain de fonction (Purohit & Auerbach, 2009). Extrapolée au récepteur sauvage, cette ouverture spontanée très brève de quelques dizaines de microsecondes apparaîtrait une fois toutes les quinze minutes.

L'état désensibilisé

D'autres états discrets sont également décrits, comme l'état désensibilisé qui est observé par électrophysiologie au niveau de la jonction neuromusculaire (Katz & Thesleff, 1957) et en canal-unique (Sakmann, Patlak, & Neher, 1980). Cet état stabilisé en présence d'agoniste est silencieux en électrophysiologie et n'est pas conductant. Il est réfractaire à l'activation et a une affinité pour l'agoniste supérieure à celle de l'état actif, cependant sa cinétique d'apparition étant plus lente que celle d'activation (Figure 11).

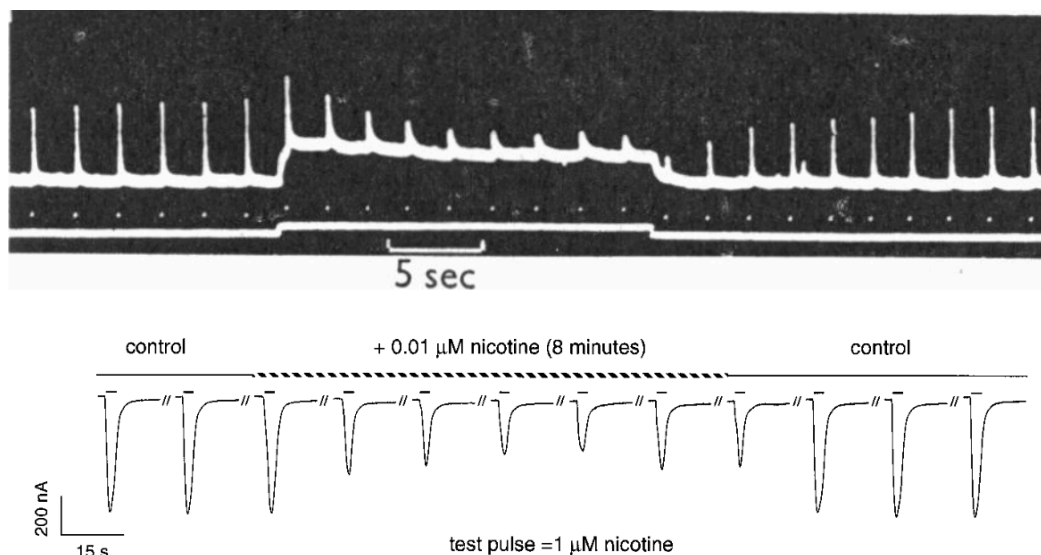


Figure 11. La désensibilisation. En haut, courants mesurés sur la plaque terminale motrice de grenouille avec un pulse d'acétylcholine appliqué régulièrement par une pipette et une deuxième délivre une concentration continue pendant une vingtaine de secondes (Katz & Thesleff, 1957). On voit la diminution de l'amplitude du courant mesuré pendant les pulses lors de l'application continue, puis le retour de désensibilisation ou les courants des pulses finissent par revenir à l'amplitude initiale. En bas, deuxième exemple sur une chimère $\alpha 7$ -5-HT₃ en ovocytes avec cette fois une faible concentration en nicotine en continue qui diminue l'amplitude de courant des pulses en recrutant les récepteurs dans l'état désensibilisé qui a une haute affinité pour l'agoniste (P.-J. Corringer et al., 1998).

Des expériences avec des applications d'agoniste à très faible concentration, insuffisante pour stabiliser un état actif montrent qu'il est possible de peupler ainsi l'état désensibilisé, démontrant cette forte affinité pour l'agoniste (P.-J. Corringer et al., 1998). Cet

état désensibilisé est présent chez les différentes familles de récepteurs aux neurotransmetteurs et permet une plasticité à court terme de la transmission des potentiels d'action lors de libération répétitive de neurotransmetteurs, en empêchant la suractivité des récepteurs (Papke, Gonzalez-Gutierrez, & Grosman, 2011). Des études en canal-unique sur le récepteur nicotinique ont permis d'émettre l'hypothèse que le portail de désensibilisation était différent de celui d'activation (Auerbach & Akk, 1998) et un mécanisme allostérique impliquant de ces deux portails émerge avec les données cinétiques et structurales (Gielen & Corringer, 2018).

Au-delà de la caractérisation de l'état désensibilisé, d'autres états intermédiaires ont été proposés entre l'état au repos et l'état actif. Pour expliquer les relations structure-fonction des RCPs et comprendre comment la liaison d'agoniste peut causer l'ouverture du canal, plusieurs modèles cinétiques ont été développés.

L'intermédiaire *flipped*

Très tôt l'observation a été faite que certaines molécules n'étaient pas aussi efficaces que l'agoniste principal pour stabiliser l'état actif (Del Castillo & Katz, 1956). Même à concentration saturante le courant maximal était plus faible pour ces agonistes appelés partiels en comparaison avec l'agoniste principal/total. L'explication alors donnée était que les agonistes favorisent plus ou moins l'état actif par rapport à celui de repos selon leur affinité. Des études plus approfondies en canal-unique sur le récepteur glycine ont permis de mesurer les probabilités d'ouverture et les temps de résidence dans un état (*dwell time*) en fonction de la concentration en glycine (Burzomato, Beato, Groot-Kormelink, Colquhoun, & Sivilotti, 2004). Le modèle cinétique qui permettait alors de rendre compte des données inclut un état fermé intermédiaire lié à l'agoniste en amont de l'ouverture du canal (Figure 12).

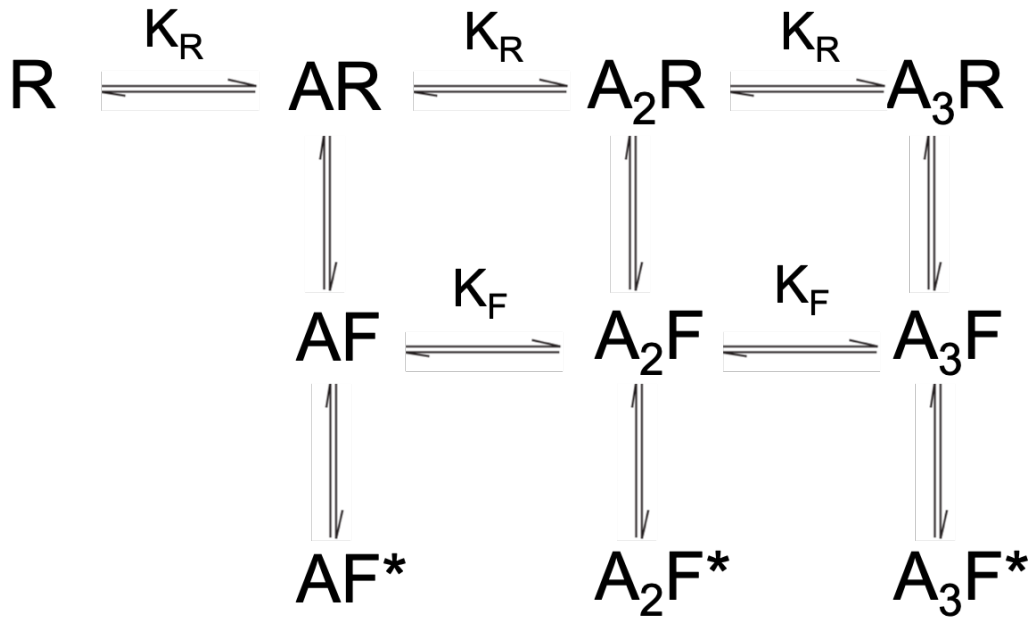


Figure 12. Modèle cinétique flipped. Avec R l'état au repos, F l'état flipped, F* l'état actif et les constantes de vitesse K associées aux différents états (Burzomato et al., 2004)

Ce modèle appelé *flipped* suggère la présence de changements conformationnels en amont de l'ouverture du canal et a été utilisé pour comprendre le fonctionnement des agonistes partiels (Lape, Colquhoun, & Sivilotti, 2008). Les analyses des enregistrements en canal-unique sur les récepteurs nicotiques et à la glycine montrent que la transition *flipped* vers actif est la même que l'agoniste soit partiel ou total, en revanche pour les agonistes partiels la transition repos vers *flipped* est beaucoup moins favorisée que pour l'agoniste total (Figure 13).

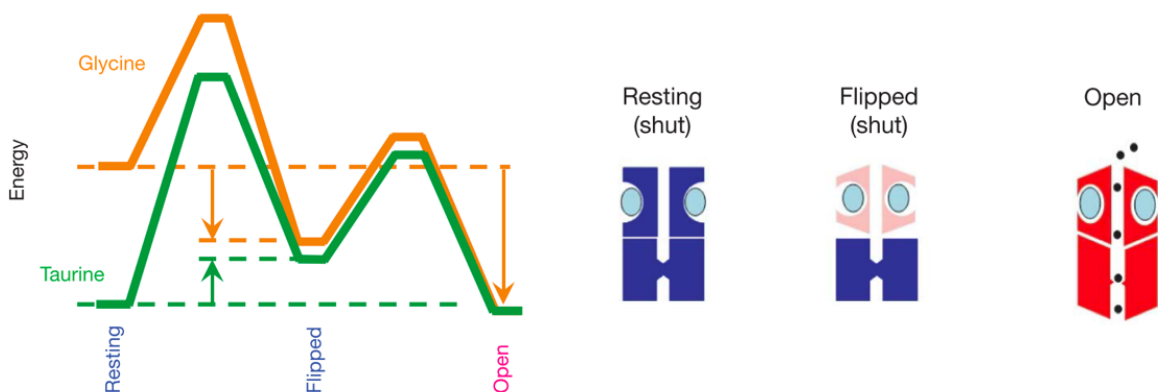


Figure 13. Agonistes partiels. Diagramme énergétique des agonistes totaux et partiels, dans l'état flipped. Avec la taurine agoniste partiel de GlyR, la transition vers l'état au repos est presque autant favorisée que celle vers l'état actif. À l'inverse, l'état actif est favorisé avec l'agoniste total glycine (Lape et al., 2008).

Les intermédiaires *primed*

Un second modèle cinétique a été proposé après le modèle *flipped* sur les bases d'enregistrements en canal-unique du récepteur nicotinique musculaire. En étudiant la longueur des périodes où le canal est ouvert ou fermé, deux populations avec le canal fermé précédant l'activation sont détectables. Ces états sont nommés *primed*, et comme pour le modèle *flipped*, la transition *primed* vers actif semble indépendante de la nature de l'agoniste (Figure 14). Le récepteur musculaire comprend seulement deux sites de liaison à l'agoniste aux interfaces α - γ et α - δ et il a été proposé que les changements de conformation au niveau d'une interface ou des deux expliquaient la présence de ces deux états fermés *primed* C' et C''. L'activation depuis l'état C' donne alors des temps de résidence dans l'état ouvert plus court que lorsque l'activation à lieu depuis l'état C''.

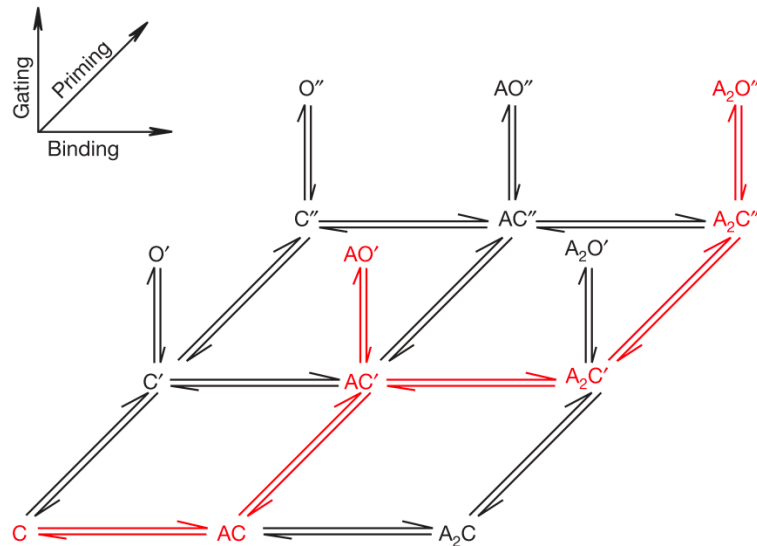
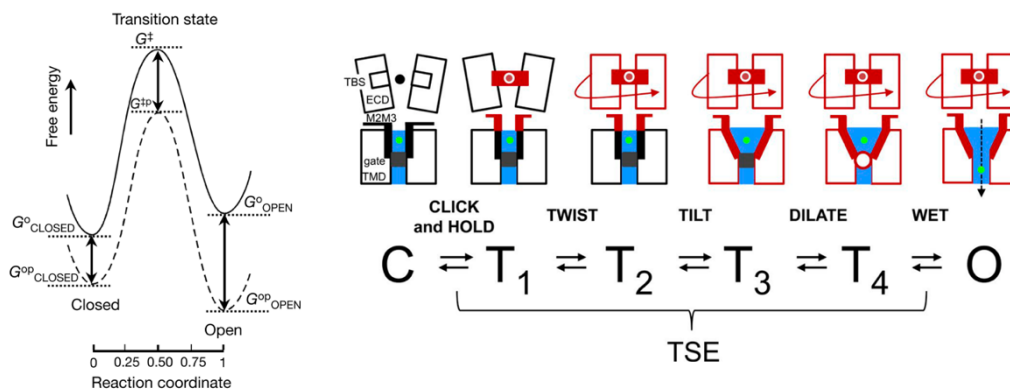


Figure 14. Modèle cinétique *primed*. Les états C sont fermés, O ouverts avec une ou deux molécules de ligand A. Les (') et (") représentent les différents degrés de priming selon si une ou deux boucles C ont bougé donnant des états actifs avec des temps de vie plus ou moins longs (Mukhtasimova, Lee, Wang, & Sine, 2009).

Étude du chemin d'activation

En parallèle de ces analyses en canal-unique qui ont permis de détecter des intermédiaires de l'activation *flipped* et *primed*, des études ont été menées pour étudier le chemin d'activation avec une approche appelée LFER (*Linear free energy relation*). L'énergie libre est calculée à partir des constantes d'équilibre et de temps issues des mesures en canal unique de récepteurs nicotiniques sauvages ou mutés (Figure 15). Il est attendu qu'une perturbation extérieure (présence de ligand ou une mutation) va affecter l'état de transition

entre les états repos et actif. Pour chaque mutant, une constante Φ est extraite et indique si l'état de transition est plus proche de l'état au repos (la valeur de Φ tend vers 1) ou l'état actif (la valeur de Φ tend vers 0) (Grosman, Zhou, & Auerbach, 2000). Une cartographie systématique des différentes régions du récepteur nicotinique montre que les valeurs Φ sont similaires pour des résidus qui sont localisés dans une même région de la structure. Les perturbations au niveau du site orthostérique et de la boucle M2M3 affectent la transition repos vers actif très tôt dans la transition (Bafna, Purohit, & Auerbach, 2008). Ces deux régions sont éloignées dans la structure et cette observation indique que l'activation ne serait pas la conséquence d'une vague conformationnelle du site orthostérique vers le canal comme cela avait pu être proposé dans la première étude de LFER. Les auteurs des études par analyse Φ proposent à partir de leur données un mécanisme d'activation qui comprend 4 intermédiaires (S. Gupta, Chakraborty, Vij, & Auerbach, 2016). Ce modèle est basé sur les études fonctionnelles en canal-unique et sans apport d'informations structurales, il reste très spéculatif. Des approches complémentaires notamment structurales sont nécessaires pour mettre au défi ce mécanisme.



$$(G^{\ddagger p} - G^{\ddagger}) = \Phi(G_{\text{OPEN}}^{\text{op}} - G_{\text{OPEN}}^{\circ}) + (1 - \Phi)(G_{\text{CLOSED}}^{\text{op}} - G_{\text{CLOSED}}^{\circ})$$

Figure 15. Chemin d'activation étudié par LFER. À gauche, diagramme d'énergie libre d'une transition du récepteur nicotinique avec un état de transition perturbé par une mutation p (chemin en pointillé). La valeur ϕ indique la ressemblance de l'état intermédiaire avec l'état actif et selon la localisation de la mutation, on peut en déduire quelles régions bougent en premier ou dernier lors de la transition. Avec un criblage des différentes régions, un modèle spéculatif a été proposé par les auteurs avec premièrement le mouvement de la boucle M2M3 du site orthostérique, suivi du twist de l'ECD puis le tilt des hélices M2. Enfin les étapes proposées sont la dilatation du canal et son hydratation (Grosman et al., 2000; S. Gupta et al., 2016).

Structure des RCPS : entre homologie et spécificité

Historique de la résolution structurale des RCPS

Les débuts de la résolution de structure de RCPS datent de la fin des années 1980, avec des études pionnières sur les nAChR musculaires de la raie électrique *Torpedo marmorata*. Les membranes postsynaptiques de l'organe électrique de ces raies (dérivé de muscle) sont très riches en récepteurs et leur isolement dans certaines conditions permet de constituer des vésicules tubulaires (Figure 16) avec les récepteurs arrangés de manière très ordonnée, quasi-cristalline (Brisson & Unwin, 1985). L'étude de ces préparations par microscopie électronique a donné les premiers modèles à basse résolution des nAChR (Toyoshima & Unwin, 1988), jusqu'à un premier modèle avec une résolution de 4 Angströms (Å) en 2005 (Unwin, 2005).

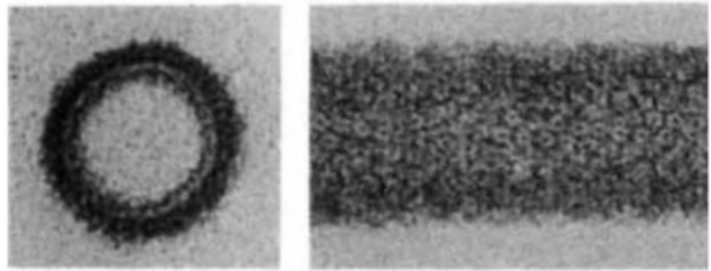


Figure 16. Les débuts de l'étude structurale des RCPS. Images obtenues par cryo-microscopie électronique de vésicules tubulaires de *Torpedo* vue de face et de profil préparées à partir des membranes post-synaptiques contenant des récepteurs musculaires (Toyoshima & Unwin, 1988). On devine la présence des rosettes formées par les pentamères présents à une très forte densité dans ces vésicules.

Pour surmonter la difficulté de produire et purifier des protéines membranaires, des modèles ont d'abord été développés sur l'AChBP qui ne possède que le domaine extracellulaire des nAChR. Chez les mollusques, cette protéine capable de lier l'acétylcholine est libérée dans la fente synaptique et module ainsi la transmission synaptique. La résolution de la structure de l'AChBP des mollusques *Lymnaea stagnalis* (Brejc et al., 2001) puis *Aplysia californica* (Hansen et al., 2005), a permis la description du site de liaison des agonistes appelé site orthostérique qui se trouve à l'interface entre deux sous-unités (Celie et al., 2004). La liaison de modulateurs allostériques et les interactions entre sous-unités ont également pu être détaillés (Christopoulos et al., 2014). Des AChBP modifiées ont ensuite été mutées pour mimer le domaine extracellulaire du nAChR $\alpha 7$ (Nemecz & Taylor, 2011) ou encore du 5-HT₃R (Kesters et al., 2013) dans le but de comprendre les bases moléculaires de la reconnaissance

des ligands des différents RCPs. Actuellement, l'AChBP continue à être modifiée pour générer des AChBP humanisées qui permettront de mieux comprendre les mécanismes de sélectivité entre des sites orthostériques formés par différentes sous-unités, par exemple entre $\alpha 4$ - $\alpha 4$ et $\alpha 4$ - $\beta 2$ (Delbart et al., 2018) ou bien dans l'optique d'utiliser les AChBP comme outils pour trouver de nouveaux modulateurs (Shahsavari et al., 2015). Certaines études structurales ont également été menées directement sur les ECD de GLIC et des récepteurs eucaryotes nAChR $\alpha 1$, $\alpha 2$ et $\alpha 9$, qui sont suffisamment stables pour s'exprimer en monomères en solution (Dellisanti, Yao, Stroud, Wang, & Chen, 2007; Kouvatso, Giastas, Chroni-Tzartou, Pouloupoulou, & Tzartos, 2016; Nury et al., 2010; Zouridakis et al., 2014). Les TMD eux aussi ont pu être étudiés séparément par microscopie électronique, diffusion aux petits angles (SAXS) et un modèle a pu être établi par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) pour le TMD de GlyR $\alpha 1$ (Mowrey et al., 2013). Les TMD se replient spontanément sous forme d'hélices et s'assemblent principalement en pentamères, indiquant un rôle important de ce domaine pour l'oligomérisation des RCPs (Mowrey, Kinde, Xu, & Tang, 2015).

Essor de la résolution structurale

Plusieurs verrous ont dû être débloqués pour résoudre la structure générale des RCPs. Le premier challenge a été d'avoir suffisamment de protéine purifiée et stable pour atteindre les quantités requises pour les techniques de résolutions structurales, entre autres la cristallographie aux rayons X. La découverte des homologues bactériens des RCPs a été un évènement clé pour relever ce défi, puisque les deux récepteurs qui ont été étudiés en détails, ELIC (Hilf & Dutzler, 2008) puis GLIC (Bocquet et al., 2009; Hilf & Dutzler, 2009) ont été résolus par cristallographie après expression et purification dans des systèmes recombinants bactériens et purification. L'étude de la structure des RCPs bactériens s'est alors développée pour déterminer le site de liaison de différents modulateurs et agonistes sur les récepteurs procaryotes (Nury et al., 2011; Pan et al., 2012) et résoudre la structure des différentes conformations. Les premières structures de GLIC ont été résolues à pH 4 dans une conformation qui semble avoir le canal ouvert et qui représenterait l'état actif. Ce récepteur est en effet activé par les protons, avec une activation maximale à pH 4. Une seconde conformation a pu être résolue à pH 7 pour lequel GLIC ne présente pas de courant en électrophysiologie et cette structure correspondrait donc à l'état de repos avec le canal fermé

(Sauguet et al., 2014). Toujours sur GLIC, des conformations intermédiaires ont été décrites via l'incorporation de mutations ponctuelles (Hu, Ataka, et al., 2018) ou bien de pontages cystéines pour contraindre la structure (Prevost et al., 2012). D'autres récepteurs procaryotes comme sTeLIC continuent à être étudiés et fournissent de nouvelles informations sur l'évolution et la diversité des RCPs. SteLIC est activé par des pH alcalins et a été cristallisé dans une conformation largement ouverte en comparaison avec l'état actif de GLIC (Hu, Nemezc, et al., 2018).

Pour contourner les limitations de l'expression des RCPs eucaryotes, des récepteurs chimères ont été créés avec l'ECD du récepteur procaryote GLIC et le TMD du GlyR $\alpha 1$ humain (Moraga-Cid et al., 2015), ou bien ELIC-GABA $\alpha 1$ humain (Chen et al., 2018). Ces chimères exprimées en cellules d'insectes ont permis de progresser dans l'étude des RCPs eucaryotes et notamment concernant la pharmacologie spécifique du TMD.

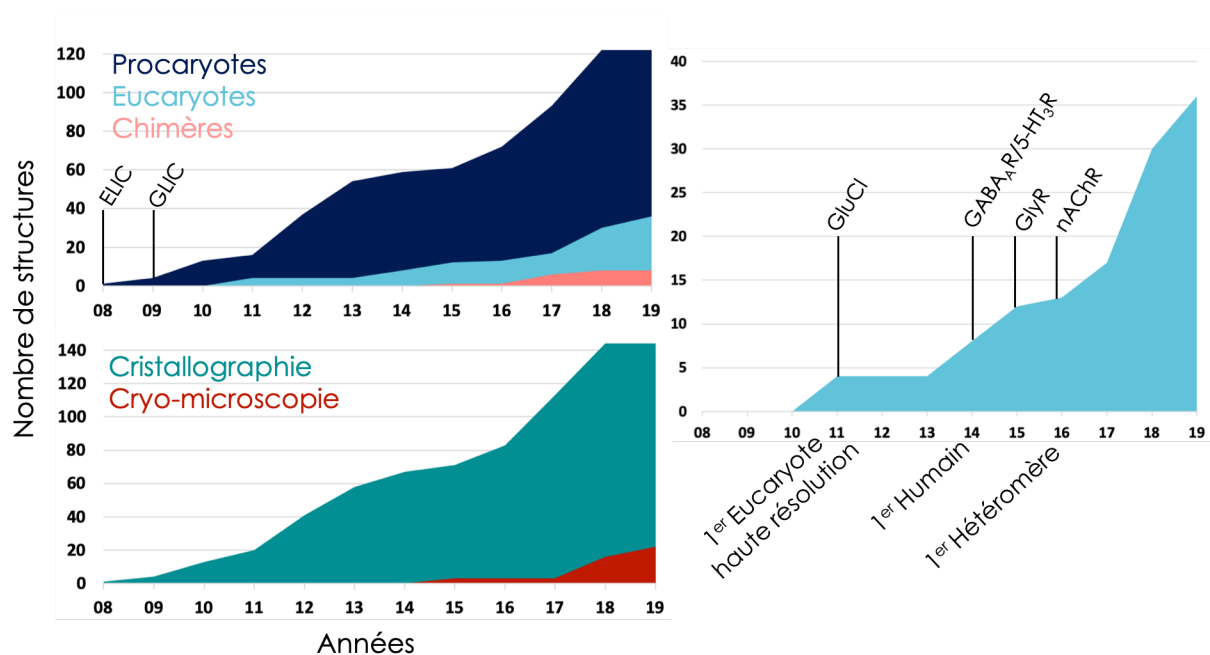


Figure 17. Évolution du nombre de structures de RCPs. Nombre de structure publiées dans la Protein Data Bank (PDB) entre 2008 et 2019, à gauche en fonction de l'origine procaryote, eucaryote ou chimères (en haut) et en fonction de la technique de résolution (en bas). À droite le nombre de structures eucaryotes est détaillé.

La surexpression et la purification des récepteurs eucaryotes requiert une mise au point lourde pour obtenir des quantités significatives de protéine (Hassaine et al., 2013), et différentes approches et techniques ont été nécessaires pour optimiser ce processus. L'une d'elle a été la chromatographie par exclusion de taille couplée à la fluorescence (FSEC) qui a été développée sur les récepteurs P2XRs (Hattori, Hibbs, & Gouaux, 2012; Kawate & Gouaux,

2006) et a été étendue à d'autres récepteurs (Goehring et al., 2014). Elle consiste à exprimer les protéines candidates pour l'étude structurale en petite quantité et fusionnées à la GFP. L'extrait cellulaire total est étudié via la détection de la fluorescence de la GFP en chromatographie et permet de sélectionner les récepteurs les plus adaptés aux études structurales avec une bonne thermostabilité et présentant une population monodisperse. Une autre approche a été l'utilisation de fragments d'anticorps ou de *nanobodies* spécifiques des récepteurs pour les stabiliser, favoriser la cristallisation ou permettre l'identification des sous-unités des hétéromères en cryo-microscopie électronique. En combinant ces différents efforts, la structure d'un premier récepteur eucaryote GluCl (Hibbs & Gouaux, 2011) a pu être élucidé par cristallographie, suivi du récepteur 5-HT_{3A} de souris (Hassaine et al., 2014) tous deux en présence de fragments d'anticorps ou de *nanobodies*. En parallèle, la première structure de récepteur humain, le GABA_A β3 a également été résolue (Miller & Aricescu, 2014). Le récepteur humain GlyR α3 ainsi que le premier récepteur hétéromérique nAChR α4β2 ont également été résolus par cristallographie (X. Huang, Chen, Michelsen, Schneider, & Shaffer, 2015; Morales-Perez, Noviello, & Hibbs, 2016).

Le nombre de structure de RCPs eucaryotes résolues par cristallographie reste encore assez limité à cause entre autres de la difficulté à cristalliser ces protéines membranaires. Dans les structures cristallographiques des RCPs eucaryotes, le domaine intracellulaire est tronqué voire complètement supprimé car étant trop flexible, il empêche la cristallisation et ne serait de toute façon probablement pas visible dans les densités électroniques. Cela représente une limite pour la compréhension des mécanismes des RCPs car il a été montré que l'absence d'ICD pouvait drastiquement impacter leur fonction (Tsetlin, Kuzmin, & Kasheverov, 2011). L'essor ces dernières années de la Cryo-Microscopie Électronique en particule unique dans l'élucidation de structure à haute résolution a permis de contourner ce problème (Cheng, 2018) et a ainsi fait décoller le nombre de structures des RCPs eucaryotes (Figure 17). Des premières structures ont été obtenues pour le récepteur GlyR α1 de poisson zèbre (Du, Wei, Wu, Cheng, & Gouaux, 2015) et de nombreuses structures ont été résolues ensuite pour le 5-HT_{3A}R et les GABA_AR α1β1γ2 et α1β3γ2 (Basak, Gicheru, Rao, Sansom, & Chakrapani, 2018; Laverty et al., 2019; Masiulis et al., 2019; Phulera et al., 2018; Polovinkin et al., 2018; S. Zhu et al., 2018). Un des avantages majeurs de la cryo-microscopie électronique est la possibilité d'obtenir plusieurs conformations à partir d'un même échantillon et donc de multiplier le nombre de structures de différents états. Cela peut être décisif pour la résolution des RCPs

hétéromères puisque différentes stœchiométries peuvent être simultanément présentes dans les conditions utilisées pour un échantillon donné (Walsh et al., 2018). On peut s'attendre à un nombre important de nouvelles structures dans le futur proche, pour compléter le jeu de données actuel (Figure 18). Ces structures pourront apporter des informations sur les différences entre sous-unités des RCPs provenant de différentes espèces, sur les variations de stœchiométries et sur les sites de liaisons des divers agonistes et modulateurs. Le prochain grand défi structural sera sans doute la résolution de la structure des RCPs en complexe avec leurs protéines partenaires, d'échafaudage par exemple. L'un des enjeux qui est en train d'émerger avec le nombre croissant de structures est d'arriver à assigner les conformations obtenues à des états fonctionnels et apprécier leur pertinence physiologique. Des approches parallèles sont donc nécessaires pour compléter ces données structurales.

GlyR	GABA	5-HT ₃	nAChR
(α 1) ₅ poisson zèbre (α 3) ₅ humain	(β 3) ₅ humain (α 1) ₂ (β 1) ₂ γ 2 rat, humain (α 1) ₂ (β 3) ₂ γ 2 humain α 5(β 3) ₄ humain	(A) ₅ souris	(α 4) ₂ (β 2) ₃ humain (α 4) ₃ (β 2) ₂ humain

Figure 18. Liste des sous-types de RCPs eucaryotes résolus avec l'espèce et la stœchiométrie.

Structure générale des RCPs

L'ensemble des structures résolues permet de dresser un portrait de la structure globalement bien conservée des RCPs (Figure 19). Sur chaque sous-unité, le domaine extracellulaire est constitué de deux feuillets β formant un sandwich, et trois boucles de l'ECD forment l'interface avec le domaine transmembranaire : la boucle 2 entre les brins β 1 et β 2 ; la boucle 7 qui est aussi appelé Cys-Loop car elle contient un pont disulfure entre deux cystéines très conservées dans la plupart des RCPs excepté chez les procaryotes et certains invertébrés (Jaiteh, Taly, & Hénin, 2016) ; et la boucle F (ou boucle 9) entre les brins β 8 et β 9 (Figure 20). Chez les eucaryotes, une hélice α plus ou moins longue selon les sous-types est présente en N-terminal. Le site orthostérique, de liaison des neurotransmetteurs, se trouve à l'interface entre deux sous-unités, et les RCPs homomériques en possèdent donc 5.

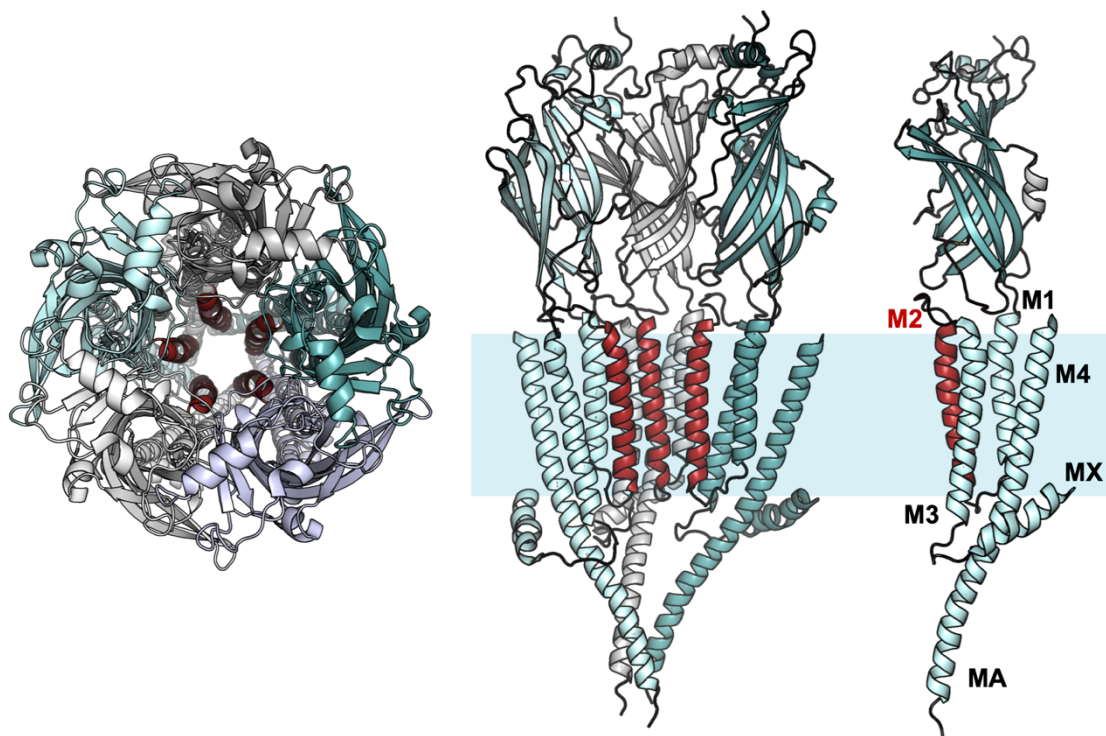
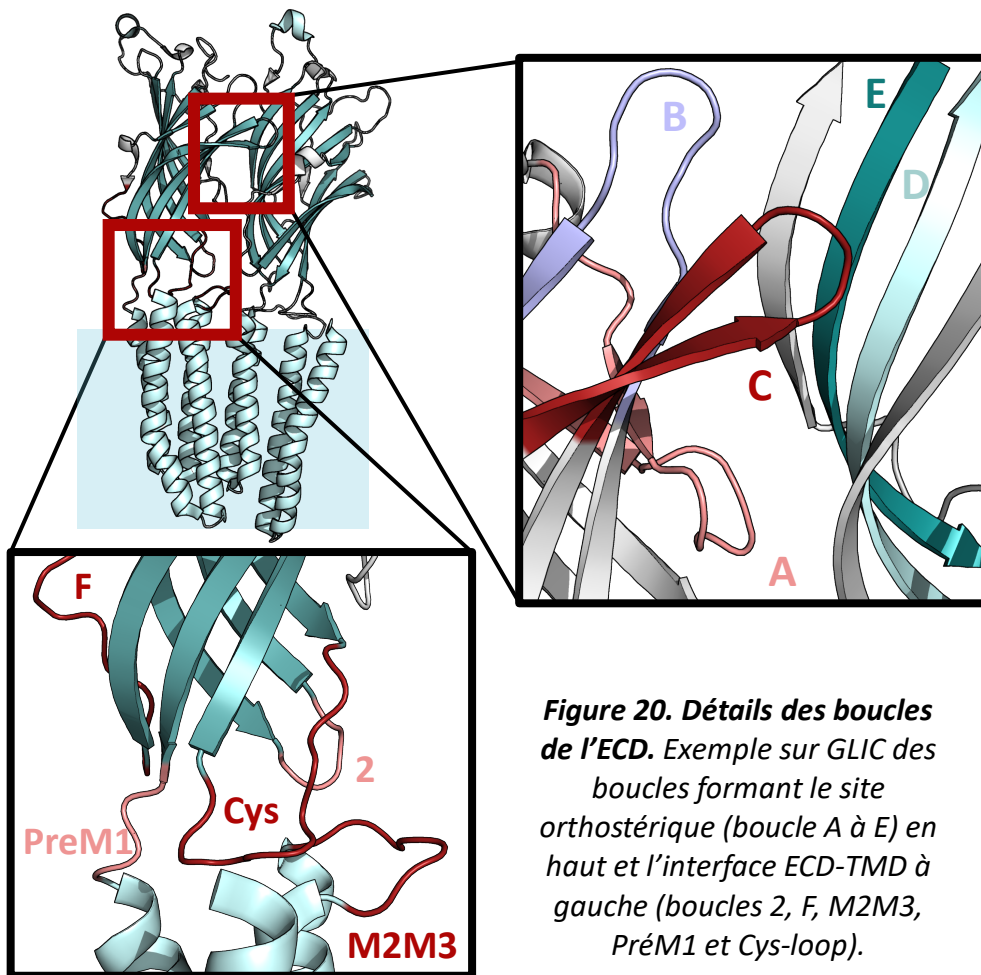


Figure 19. Structure générale des RCPs. Exemple du récepteur à la sérotonine (4PIR) avec les 5 sous-unités de couleurs différentes et l'hélice M2 formant le canal en rouge. Vue du dessus (à gauche) et vue de côté (au milieu) avec la membrane en bleu. À droite une sous-unité isolée est représentée avec les différentes hélices détaillées.

Le site orthostérique est constitué des boucles A, B et C d'une sous-unité et des boucles D et E de la sous-unité adjacente (appelées sous-unités principale et complémentaire). Le neurotransmetteur est stabilisé par des résidus aromatiques des différentes boucles et la boucle C referme le site d'orthostérique. Chez les GlyR et GluCl et certains sous-types des nAChRs α , cette boucle contient un pont disulfure supplémentaire. Il a été montré sur le modèle de l'AChBP que le neurotransmetteur était stabilisé par des interactions cation- π entre les résidus aromatiques formant la poche orthostérique et l'amine tertiaire/quaternaire chargée de l'agoniste, qui est le pharmacophore commun et central des neurotransmetteurs. Certains récepteurs hétéromériques contiennent des interfaces qui ont des affinités différentes pour l'agoniste, voire même des interfaces sur lesquels il ne se lie pas du tout. Par exemple chez les nAChR $\alpha 4\beta 2$, les interfaces α - α et α - β lient l'acétylcholine avec différentes affinités mais ce n'est pas le cas des interfaces β - α (avec α en sous-unité complémentaire) alors qu'au contraire les GABA_AR lient l'agoniste à cette interfaces β - α . Des variations de quelques résidus faisant parties du site orthostérique peuvent en effet

compromettre la liaison de l'agoniste, et selon les sous-unités qui forment l'interface la pharmacologie sera différente.

Le domaine transmembranaire est lui composé de quatre hélices α par sous-unité (M1 à M4) avec les hélices M2 des cinq sous-unités formant le canal dans l'axe de symétrie. M2 interagit avec M1 et M3 qui sont en contact avec M4, cette dernière à la périphérie constitue la principale interface du TMD avec les lipides. Le segment pre-M1 fait la connexion entre la partie extracellulaire et transmembranaire, et contribue à l'interface ECD-TMD avec la boucle M2-M3. Du côté cytoplasmique, la boucle entre M1 et M2 ne comporte que quelques résidus, en revanche la boucle M3-M4 est très variable selon le type de RCPs et de sous-unité et forme chez les eucaryotes un large domaine intracellulaire (ICD).



Ce domaine intracellulaire est en partie non-structuré avec néanmoins une hélice MX proche de M3 qui est perpendiculaire à la membrane et une autre hélice MA qui est dans le prolongement de M4. Ce domaine intracellulaire a un rôle clé dans le trafic et l'adressage des

RCPs eucaryotes car il est le site principal des interactions avec les protéines d'échafaudage et de régulation. On trouve aussi dans cette région les principaux sites de phosphorylation.

Malgré une grande divergence de séquences, le repliement général des RCPs reste très conservé. L'alignement des différentes séquences souligne néanmoins quelques résidus hautement conservés qui se trouvent à l'interface ECD/TMD et à l'interface entre sous-unités. Parmi eux on retrouve un pont salin Arginine-Aspartate entre le segment pre-M1 et la Cys-loop ; trois Prolines sur la boucle M2M3, la Cys-loop et sur l'hélice M1 ; et des résidus hydrophobes sur la Cys-loop et la boucle F (Jaiteh et al., 2016).

Sélectivité du canal

Les résidus formant le canal le long de M2 sont aussi bien conservés (Figure 21). Une nomenclature en « prime » est utilisée pour cette partie de la séquence avec comme référence le résidu chargé positivement (lysine ou arginine) en bas du canal très conservé chez les eucaryotes en position 0', coté N-terminal de M2. On retrouve des résidus polaires également bien conservés en 2' et 6' (sérine ou thréonine) et des résidus hydrophobes en 9' et 16' (leucine ou isoleucine). En position -1' ou -2' un résidu chargé négativement est présent chez les récepteurs cationiques et absent chez les anioniques. Chez les récepteurs perméables aux anions, une insertion est présente à cet endroit. En mutant le glutamate en alanine en -1' du récepteur nicotinique $\alpha 7$ et en rajoutant une proline, il a été montré que la sélectivité du canal pouvait être inversée, mettant en évidence le filtre de sélectivité aux charges du canal (P. J. Corringer et al., 1999). Généralement les extrémités du canal sont chargées positivement pour les récepteurs anioniques GABA_AR et GlyR avec des arginines en 0' et 19', et chargés négativement pour les cationiques nAChR et 5-HT₃R avec des aspartates ou glutamates en -2' et 20'.

Dans les différentes structures, les résidus du canal forment des cercles concentriques avec un diamètre plus ou moins important selon leur position, et l'état ouvert ou fermé du canal (Figure 22). Dans les structures considérées comme représentant l'état fermé, on retrouve un point de constriction en 9' et 13' qui constitue le portail hydrophobe du canal (GLIC pH7, GlyR en présence de strychnine). En revanche, dans celles supposées représenter un état actif, le point de constriction le plus petit se trouve en -2/2'. La compréhension du chemin de perméation des ions continue à évoluer notamment avec les études en dynamique moléculaire qui complètent les informations structurales et devraient apporter de nouvelles informations sur la concentration d'ions dans le vestibule et sur leur chemin d'accès au canal, à la fois coté intra et extracellulaire.

	-2'-1'	2'	6'	9'	13'	16'	20'
ELIC (shut)	F-SEL	QTS	FTL	MLT	VVAV	AFY	TSN
GLIC (open)	Y-EAN	VLV	STL	IAH	IAFN	ILV	ETN
nAChR α 1	S-GEK	MTLS	ISV	LLS	LVFL	LVIV	EEL
5HT _{3A} R	S-GER	VSF	KIT	LLL	LGYS	VFLI	IVSD
GABA _A α 1	SVPAR	TVFG	TVT	VTMT	TLSI	SAR	HHS
GABA _A β 2	ASAAR	VAL	GITT	TVLT	MTT	INT	HLRE
GlyR α 1	AAPAR	VGL	GITT	TVLT	MTT	QSS	SGSR
GluCl α (open)	AI	PAR	VTL	GVTT	LLT	MTA	QSA

Figure 21. Conservation de la séquence de M2. Alignement des séquences de M2 des différents RCPs avec la numérotation en (''). On retrouve un résidu hydrophobe conservé en 9' et un polaire en 6' ainsi que des charges négatives en 20' et -1/-2' chez les RCPs cationiques (Smart & Paoletti, 2012).

En dehors du TMD, deux autres régions régulent la conductance du canal. Dans l'ECD le vestibule qui le prolonge contient des anneaux de charges négatives chez les récepteurs nicotiques qui forment un environnement électrostatique modulant le flux ionique. Dans l'ICD des 5-HT₃R, il a été montré que les hélices MX constituent un portail latéral formé par des arginines, en effet leur mutation a une influence sur la conductance unitaire du canal (Hassaine et al., 2014; Kelley, Dunlop, Kirkness, Lambert, & Peters, 2003). Ces résidus caractéristiques agissent comme filtre de « conductivité » extérieur au canal et pourrait également agir sur la concentration ionique locale à ses extrémités par exemple en freinant la conductance à cause d'interactions électrostatiques défavorables.

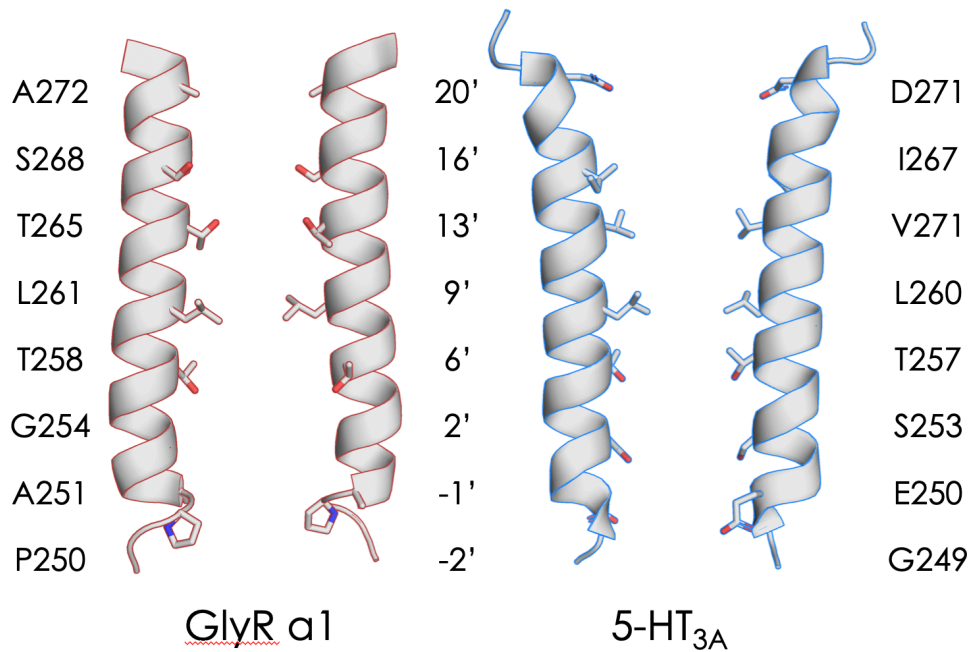


Figure 22. Profil du canal. Composition des résidus formant le canal du récepteur anionique GlyR α1 et du récepteur cationique 5-HT_{3A}. la numérotation (') des résidus est indiquée au centre. Les structures sont celles en présence d'antagoniste (strychnine et tropisetron respectivement) et l'on peut voir une constriction au niveau 9'.

Pharmacologie des RCPs

Il existe une grande variété de ligands des RCPs, dont certains ont une implication thérapeutique et pharmacologique importante comme c'est le cas des analgésiques et des anesthésiques généraux par exemple. Il existe plusieurs sites de liaison des modulateurs en plus du site de liaison à l'agoniste qui sont principalement à l'interface entre sous-unités, et plusieurs classes de modulateurs lipophiles agissent dans le domaine transmembranaire (Figure 23). L'identification des sites de liaison et du mode d'action de ces molécules est étudié à l'aide de plusieurs techniques. L'électrophysiologie donne les principales informations sur l'effet fonctionnel et des études plus détaillées par mutagenèse proposent la localisation de leur site de liaison, qui peut ensuite être confirmé par des études structurales par co-cristallisation ou microscopie électronique. Plusieurs techniques permettent de mesurer l'interaction molécule-protéine par radio-marquage, résonance magnétique nucléaire ou encore résonance plasmonique de surface et rendent possible la mesure de l'affinité de liaison.

Les sites de liaisons des agonistes et modulateurs sont décrits par domaines dans les parties suivantes.

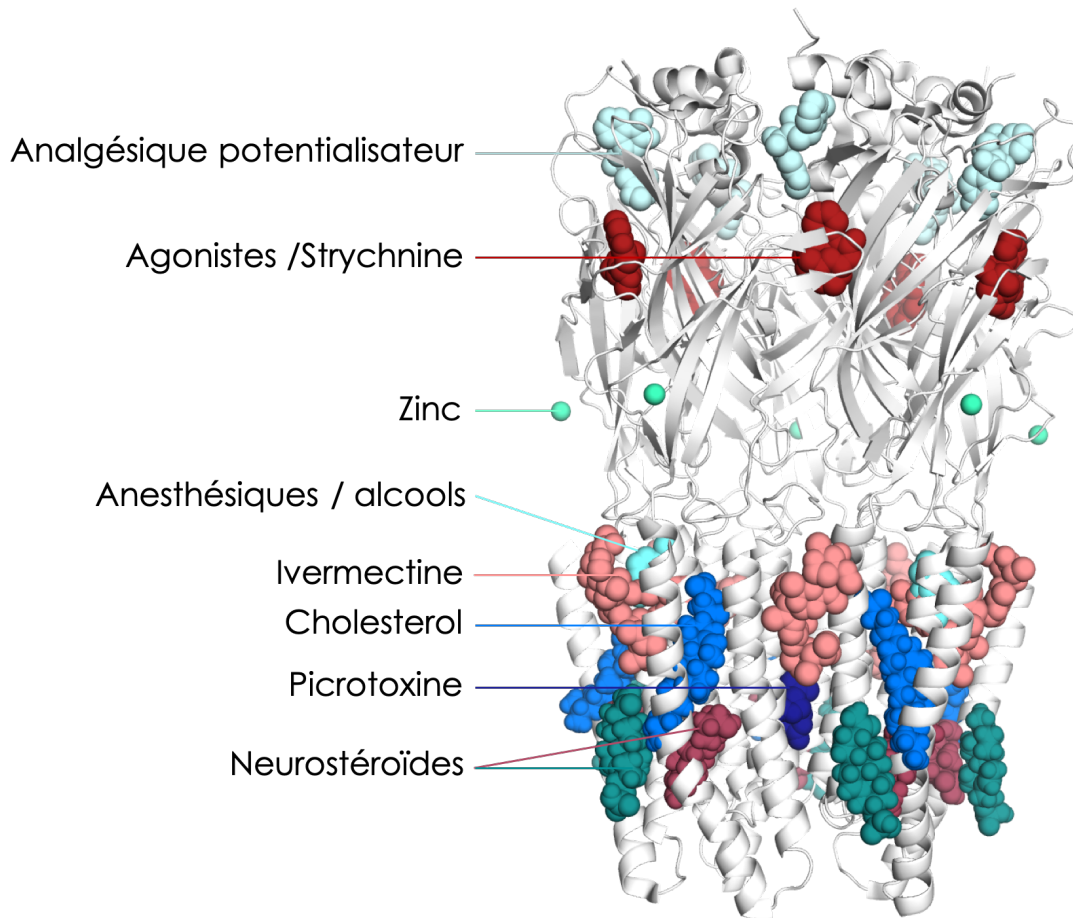


Figure 23. Poches pharmacologiques du GlyR. Superpositions de la structure du récepteur Glycine avec différents modulateurs représentés en sphères dont les sites de liaison ont été résolus en co-structures soit avec GlyR : analgésique AM-3607, strychnine, zinc et ivermectine ; avec GLIC : éthanol et propofol, avec GABA_AR : picrotoxine ou avec une chimère GLIC-GABA_AR : cholestérol et neurostéroïdes.

Pharmacologie du site orthostérique

Le site orthostérique est défini par sa capacité de liaison de l'agoniste endogène et de ses dérivés. Ces agonistes peuvent être totaux ou partiels, naturels ou non naturels et on trouve aussi des antagonistes compétitifs qui se lient dans cette poche (Figure 24).

Avec les structures résolues récemment on commence à avoir une bonne idée de l'orientation des petites molécules agonistes et antagonistes dans la poche orthostérique, avec l'ammonium tertiaire ou quaternaire placé toujours au même endroit et stabilisé par des interactions cation- π avec les résidus aromatiques qui forment cette poche (Figure 25).

La nicotine se lie dans la poche orthostérique des nAChRs et ses dérivés néo-nicotinoïdes se lient aux nAChR des insectes grâce à l'interaction avec des résidus spécifiques du site orthostérique (Matsuda, Kanaoka, Akamatsu, & Sattelle, 2009). D'autres modulateurs du site orthostérique ont une taille plus importante comme c'est le cas de l' α -bungarotoxine, extrait de venin de serpent qui est un antagoniste très puissant des nAChR musculaires (Dellisanti et al., 2007). Sa découverte a permis d'avancer dans la connaissance des détails de la structure des nAChR avec diverses applications en la conjuguant avec des composés fluorescents ou radioactifs, ou encore pour purifier le récepteur par chromatographie par affinité (Albuquerque et al., 2009). Sur GLIC l'acide caféique a été découvert comme inhibiteur se liant au niveau du site orthostérique (Prevost et al., 2013).

	nAChR	5-HT ₃ R	GABAR	GlyR	GLIC	ELIC
Agonistes	Acétylcholine Nicotine Epibatidine Lobelline	Sérotonine mCPBG	GABA	Glycine Taurine β -Alanine	Aucun	GABA Cystéamine
Antagonistes	α -bungarotoxine	Odansétron Encenicline Tropisétron Granisétron	Gabazine	Strychnine	Acide caféique	Acétylcholine

Figure 24. Liste non-exhaustive des modulateurs du site orthostériques des RCPs.

Sur les récepteurs hétéromériques, les agonistes ne se lient pas à toutes les interfaces. Sur les nAChR, ce sont les interfaces α - β et α - α qui sont liantes alors que ce sont les interfaces β - α qui le sont pour les GABA_AR. Des interfaces non liantes pour l'agoniste peuvent néanmoins constituer des sites de liaisons pour des modulateurs et dans ce cas, le site est appelé pseudo-orthostérique. C'est le cas pour les interfaces α - γ des GABA_AR qui sont le site de liaison des benzodiazépines, un potentialisateur couramment utilisé comme anxiolytique (Bergmann, Kongsbak, Sørensen, Sander, & Balle, 2013).

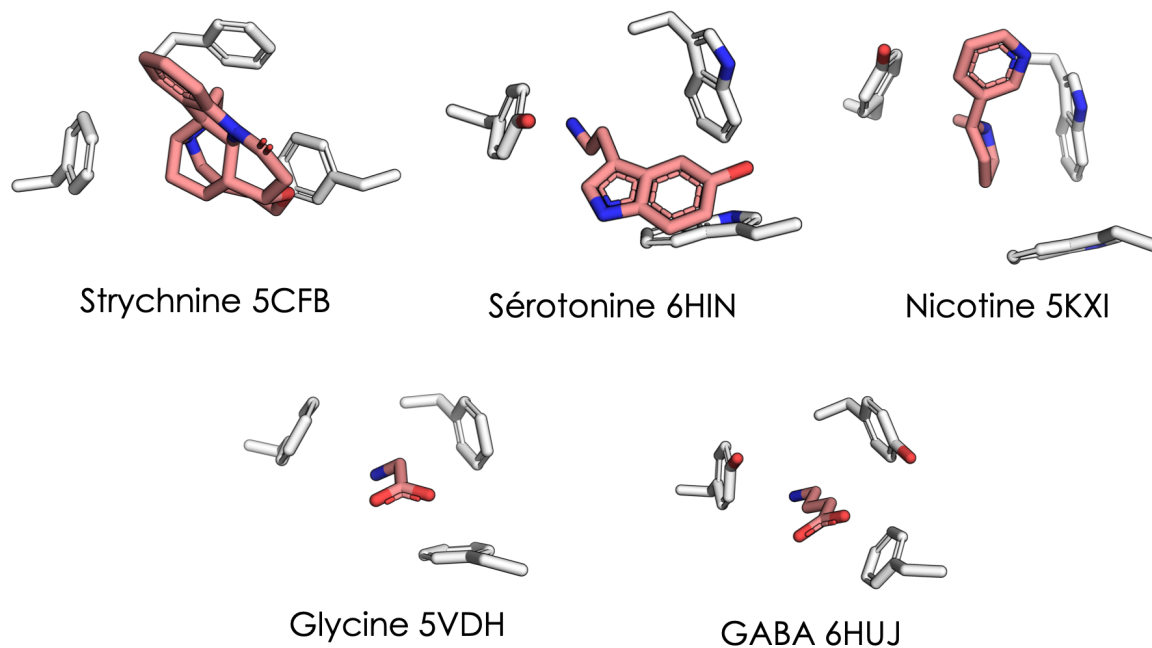


Figure 25. Coordination du ligand. Coordination d'agonistes et antagonistes dans le site orthostérique par les résidus aromatiques conservés des boucles A,C et D. L'amine du ligand est stabilisée par des interactions cation- π avec les cycles aromatiques.

Autres sites allostériques de l'ECD

En plus du site orthostérique, les sites dits allostériques correspondent à des sites de liaisons de modulateurs qui sont différents du site de l'agoniste. On trouve des modulateurs allostériques négatifs (NAM) qui inhibent le courant évoqué par l'agoniste, et des modulateurs allostériques positifs (PAM) qui sont parfois suffisamment puissant pour induire une activation en absence d'agoniste.

Un site de liaison a récemment été caractérisés en haut de l'ECD du GlyR (Figure 26), où des molécules analgésiques peuvent avoir un effet potentialisateur comme c'est le cas du AM-3607 sur GlyR α 3 (X. Huang et al., 2016). Un autre site de potentialisation a été caractérisé dans l'ECD avec la structure des procaryotes ELIC et sTeLIC co-cristallisés avec la benzodiazépine flurazépam et l'acide bromo-cinnamique respectivement. Ce site se trouve à la hauteur du site orthostérique mais coté vestibule, tout en haut du sandwich β .

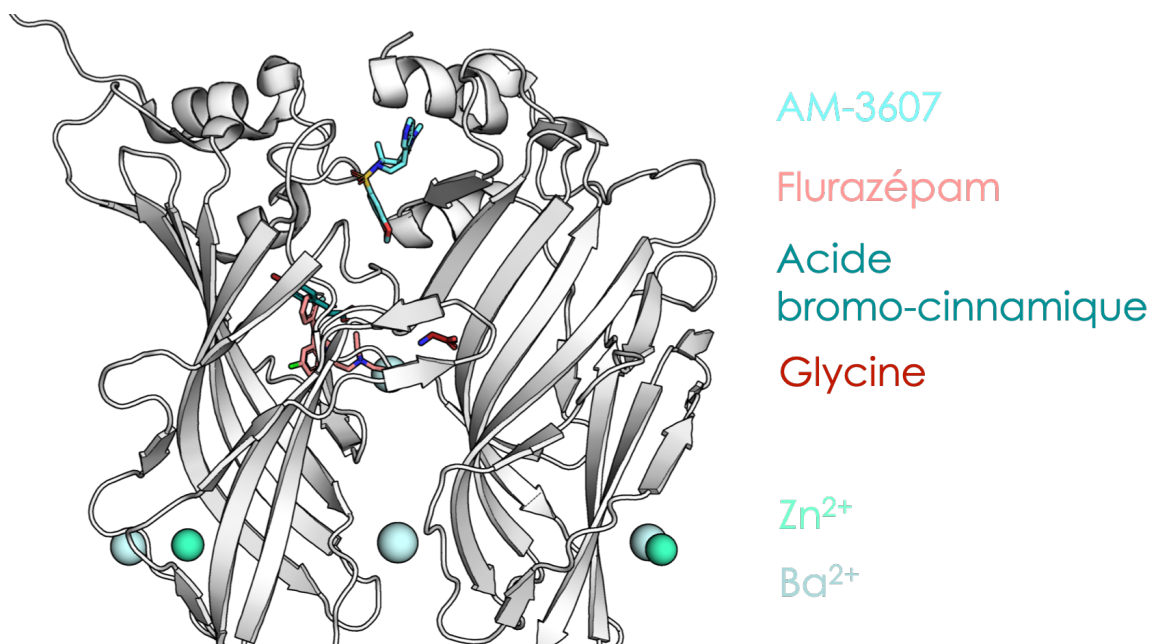


Figure 26. Sites pharmacologiques de l'ECD. Deux sous-unités du GlyR sont représentés. En dehors du site orthostérique ici occupé par la glycine sur le GlyR, on trouve un site tout en haut de l'ECD, également à l'interface et qui lie le potentialisateur analgésique AM-3607 chez le GlyR $\alpha 3$. À l'arrière du site orthostérique, on voit l'acide bromo-cinnamique trouvé sur STeLIC et le flurazépam sur ELIC qui définissent un autre site de potentialisation. Il existe également des sites de coordination de cations divalents, 2 sont représentés ici pour le zinc Zn^{2+} et 4 pour le baryum Ba^{2+} .

Certains RCPs sont également modulés par les cations divalents Ca^{2+} et Zn^{2+} , en particulier le calcium potentialise les nAChR et inhibe les 5-HT₃R (Mulle, Léna, & Changeux, 1992; Peters, Hales, & Lambert, 1988). Des sites de liaison potentiels ont également été identifiés par la présence de cations divalents Ba^{2+} dans la partie basse de l'ECD de ELIC (Zimmermann, Marabelli, Bertozzi, Sivilotti, & Dutzler, 2012) et le Zinc est visible dans la structure de GlyR $\alpha 3$ (X. Huang, Chen, & Shaffer, 2017).

Les tropéines sont une classe de molécules antiémétiques qui sont des antagonistes des 5-HT₃R. Ils potentialisent les GlyR $\alpha 1$ mais inhibent les $\alpha 3$, et le site de liaison pour ces derniers serait adjacent au site orthostérique (San Martín et al., 2019).

Les *nanobodies* sont des domaines isolés d'anticorps développés par le système immunitaire des camélidés. Dirigés contre des RCPs, ils peuvent avoir une très grande spécificité pour un type voire une sous-unité particulière. Il a été montré que certains ont un effet modulateur sur l'activité du récepteur qu'il cible comme c'est le cas pour le *nanobodies* contre le 5-HT_{3A}R qui est un inhibiteur (Hassaine et al., 2014) ou ceux développés contre les GPCRs mGlu2 qui ont un effet potentialisateur (Scholler et al., 2017). La plupart des *nanobodies* caractérisés ont leur site de liaison dans l'ECD et par exemple, le *nanobody*

développé contre 5-HT_{3A}R se lie à l'interface entre sous-unités au niveau du site orthostérique, expliquant ainsi son effet inhibiteur par compétition avec les agonistes (Figure 27).

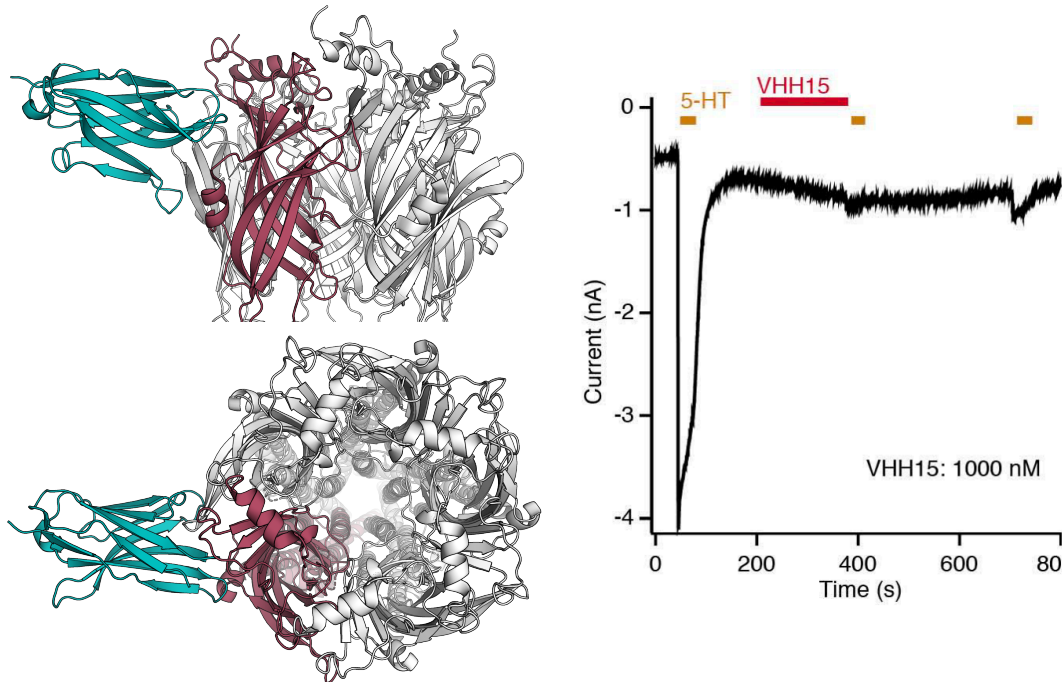


Figure 27. Modulation par les anticorps. Exemple du site de liaison d'un nanobody sur le 5-HT_{3A}R vue du dessus et de côté. À droite, effet inhibiteur de la pré-application du nanobody sur les récepteurs sérotonine exprimés en cellules HEK (Hassaine et al., 2014).

Modulateurs dans le TMD

Plusieurs cavités sont présentes dans le haut du TMD, l'une intra-sous unité, l'autre inter-sous unité (Figure 28). Les anesthésiques généraux comme le propofol et le desflurane se lient dans ces deux cavités ce qui pourrait expliquer leur double effet inhibiteur/potentialisateur selon les conditions et les RCPs (Nury et al., 2011). Une étude par modélisation indique un effet bloquant du canal par les anesthésiques avec une affinité micromolaire du propofol dans le canal GLIC (LeBard, Hélin, Eckenhoff, Klein, & Brannigan, 2012) et une densité électronique est trouvée pour le bromoforme sur ELIC dans le canal au-dessus de la constriction en 9' (Spurny et al., 2012). Dans une autre étude l'isoflurane, un autre anesthésique, est retrouvé dans le canal en 6' ou en 13' en présence d'agoniste (Chen et al., 2015). Récemment il a été montré sur GLIC cette fois que le propofol peut être trouvé dans le canal, mais au niveau de la constriction en 2' (Fourati et al., 2018). Le propofol étant très lipophile, il semble que le mécanisme de potentialisation peut persister par un échange entre le site inter sous-unité et un réservoir de molécule de propofol que constitue la membrane (Heusser et al., 2018). Avec ces différentes études, le site de liaison dans le canal semblerait

être le site d'inhibition principal alors que les deux cavités dans le haut du TMD inter et intra sous-unité seraient des sites potentialisateurs.

Les RCPs sont modulés par certaines molécules d'alcool avec un effet bimodal, le méthanol et l'éthanol ont en effet potentialisateur alors que les alcools plus longs sont inhibiteurs (Howard et al., 2011). La structure du mutant de GLIC F14'A particulièrement sensible à la potentialisation par l'éthanol a été résolue en présence de cette molécule indiquant un site de liaison inter sous-unités (Sauguet, Howard, et al., 2013).

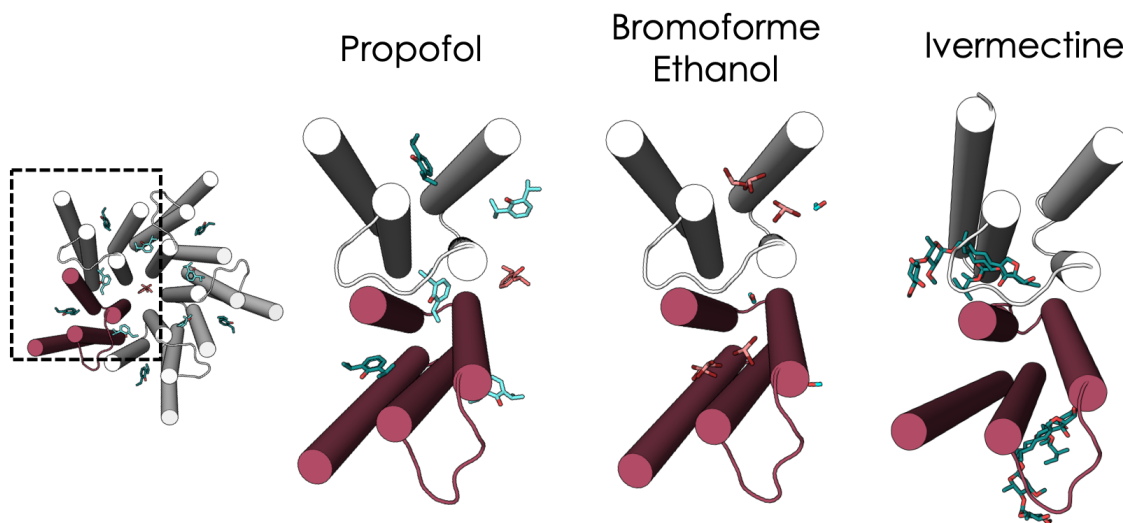


Figure 28. Sites du TMD. Vue de haut du TMD de GLIC, une sous-unité est identifiée en rouge. Le 1^{er} zoom montre la liaison de molécules de propofol dans le canal (rose), inter sous-unité (bleu) et intra sous-unité (vert). Le 2^{ème} zoom montre l'éthanol inter sous-unité (bleu) et le bromoforme intra sous-unité (rose). Le 3^{ème} zoom montre des molécules d'ivermectine inter sous-unité.

L'ivermectine est une molécule anthelminthique qui active les récepteurs GluCl des arthropodes et nématodes mais module également les GlyR, GABA_AR et nAChR (Lynagh & Lynch, 2012). Son site de liaison est décrit par des co-structures avec GluCl, et les GlyR $\alpha 1$ et $\alpha 3$ et se trouve en haut du TMD à l'interface entre sous-unités (Du et al., 2015; Hibbs & Gouaux, 2011; X. Huang et al., 2017). Ce site est partiellement superposé avec le site inter sous-unité des anesthésiques.

Le PNU est un puissant potentialisateur de nAChR $\alpha 7$ dont le site de liaison n'a pas encore été caractérisé à haute résolution (Hurst et al., 2005). Cette molécule pourrait être utilisée comme neuroprotecteur en modulant l'activité des nAChR $\alpha 7$ (Kalappa, Sun, Johnson, Jin, & Uteshev, 2013) et dans les approches thérapeutiques dans certaines maladies psychiatriques et neurodégénératives (Alzarea & Rahman, 2018).

Interaction avec la membrane

D'autres molécules comme les cannabinoïdes et les neurostéroïdes ont un effet direct sur les GlyR (Yevenes & Zeilhofer, 2011). Les neurostéroïdes sont des modulateurs allostériques positifs qui se lient dans le TMD. Sur des chimères GLIC-GABA_AR deux sites de liaison ont pu être caractérisés (Figure 29). Un premier site à l'interface TMD/lipides au niveau des hélices M3 et M4 intra sous-unité a été caractérisé par la liaison de la molécule de prégnénolone, un neurostéroïde naturel (Laverty et al., 2017). Un autre site toujours à l'interface avec les lipides mais plus profond dans le TMD a été caractérisé pour lier, deux neurostéroïdes similaires l'alfaxolone (Chen et al., 2018) et le tétrahydrodeoxycorticostérone (THDOC) (Laverty et al., 2017).

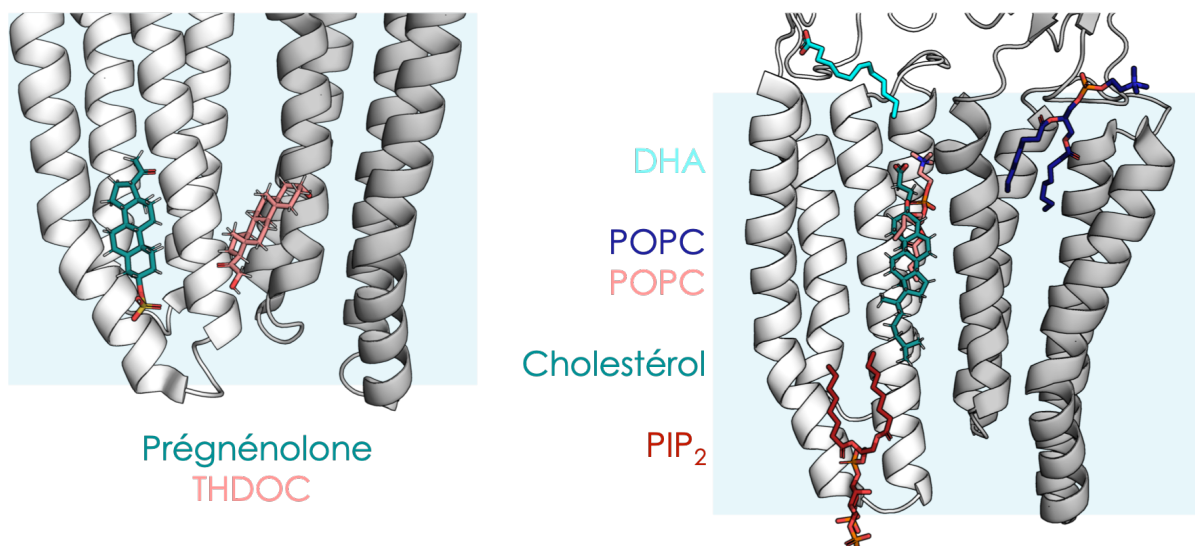


Figure 29. Interactions à l'interface TMD - lipides. À gauche, structure du bas du TMD de la chimère GABA_AR-GLIC avec deux sites de neurostéroïdes identifiés. À droite, superposition du TMD de GLIC avec le cholestérol vu dans la chimère et quelques lipides identifiés dans différentes structures : les molécules de PIP₂ sur les GABA_AR α 1 ; le DHA sur GLIC ; les molécules de POPC sur GluCl (rose) et sur GLIC (bleu foncé).

Les hélices M1, M3 et M4 interagissent avec la membrane et on retrouve des lipides dans les structures cristallographiques et cryo-microscopie des RCPs, avec parfois une densité électronique suffisante pour permettre leur identification (Figure 29). Ces lipides ont probablement une affinité significative pour le TMD pour rester ainsi lié pendant les différentes étapes de purification en détergent. Il a été montré sur le récepteur GluCl que la présence de lipides phosphatidylcholine (POPC) pouvait influencer l'état dans lequel le récepteur cristallise (Althoff, Hibbs, Banerjee, & Gouaux, 2014). Les molécules de POPC

résolues se lient profondément dans la cavité inter sous-unité sous la boucle M2M3 et Il est probable que ces lipides aient une influence sur la fonction des RCPs. Plus récemment des molécules de phosphatidylinositol-4,5-biphosphate (PIP₂) ont été résolues sur le récepteur GABA_A après purification et reconstitution en nano-disques démontrant la haute affinité de certains composant de la membrane (Masiulis et al., 2019). Un site de liaison de l'acide docosahexanoïque (DHA) a été identifié sur GLIC en haut du TMD en interaction principalement avec M4 (Basak, Schmandt, Gicheru, & Chakrapani, 2017).

Bloquants du canal

Comme cela été vu pour certaines molécules anesthésiques, on peut trouver un site de liaison à l'intérieur du canal pour lequel le courant est inhibé lorsque le bloquant du canal se lie dans l'état actif. Le site peut se trouver à différents niveaux dans le canal et ces molécules inhibent de manière peu sélective les RCPs en bloquant physiquement le flux d'ions lorsque le canal est ouvert. Il est possible qu'en plus de cet effet inhibiteur, le bloquant ait également un effet allostérique qui est compliqué à caractériser par électrophysiologie car difficile à dissocier de l'effet bloquant. On retrouve par exemple le ginkgolide C comme bloquant des GlyR (Hawthorne, Cromer, Ng, Parker, & Lynch, 2006). Le site de liaison d'autres bloquants du canal a pu être identifié par mutagenèse mais aussi grâce à la résolution de co-structures avec les RCPs procaryotes ELIC et GLIC (Figure 30). C'est le cas de la lidocaïne, la mémantine, le tétraéthylammonium (TEA, un anesthésique local) ou l'ion zinc qui illustrent bien les différents sites de liaison que l'on peut trouver le long du canal (Sauguet, Shahsavar, & Delarue, 2015; Ulens et al., 2014). Le bloquant le mieux caractérisé est la picrotoxine qui est un bloquant général des RCPs (Das & Dillon, 2005; Erkkila, Weiss, & Wotring, 2004). Ce bloquant se lie sur les GABA_AR en bas du canal entre les positions 2' et 6' (Masiulis et al., 2019). Il a été montré que la picrotoxine avait en plus de l'effet bloquant, un effet allostérique en empêchant l'entrée dans l'état désensibilisé et en stabilisant l'état actif et un état au repos dans lequel la molécule de picrotoxine ne peut pas se dissocier (Gielen & Corringer, 2018).

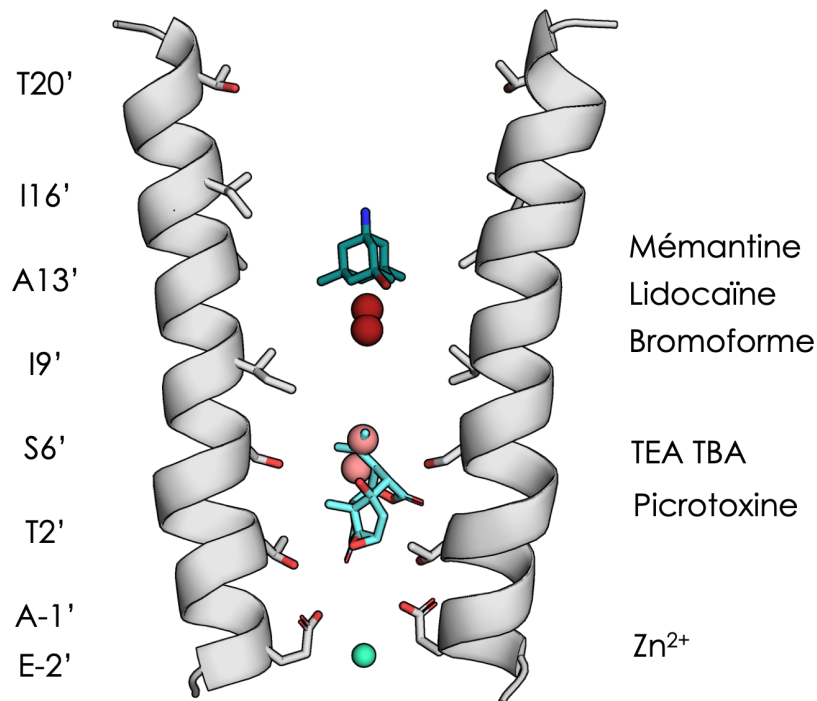


Figure 30. Bloquants du canal. Position des différents bloquants des RCPs le long du canal. Le zinc se lie en -2', la picrotoxine en 2' alors que la lidocaïne et la mémantine se lient plus haut dans le canal au niveau 9'/13' avec le bromoforme. Le tétra-ethyl-arsonium (TEA) et le tétra-butyl-antimony (TBA) se lient au même niveau que la picrotoxine. Pour la détection des molécules dans les structures cristallographiques, des dérivés contenant des atomes lourds sont souvent utilisés pour faciliter leur détection.

Prédiction de nouveaux modulateurs

Même si la pharmacologie des RCPs est très riche, il reste difficile de trouver des modulateurs spécifiques d'un sous-type de RCPs ou même qui soient spécifique d'une sous-unité ou interface particulière. Différentes approches sont développées pour découvrir des nouveaux modulateurs, notamment en modélisation par exemple en faisant du *docking* moléculaire rationalisé (Yuan & Xu, 2018) ou en faisant des simulations des cavités présentes dans la protéine (Desdouits, Nilges, & Blondel, 2015; Monet, Desdouits, Nilges, & Blondel, 2019). Il est probable que les caractéristiques des cavités pouvant accueillir des modulateurs évoluent selon les états des RCPs et leur conformation. Une meilleure compréhension structurale des transitions des RCPs pourrait mener à une conception de modulateurs originaux avec l'identification de molécules qui auraient l'effet potentialisateur ou inhibiteur voulu en se liant préférentiellement à un état spécifique.

Transitions conformationnelle des RCPs

L'étude des transitions conformationnelles est nécessaire pour la compréhension du fonctionnement de ces protéines allostériques. Parmi toutes les structures qui ont été résolues, GLIC a été le premier récepteur dont plusieurs conformations ont été décrites. La structure de l'état de repos à pH 7 (Sauguet et al., 2014) a été résolue quelques années après celle de l'état actif (Bocquet et al., 2009). La comparaison de ces deux structures a permis une première description des changements conformationnels qui pourraient avoir lieu pendant la transition entre ces deux états. Le récepteur GluCl a également été résolu dans sa forme Apo sans ligand (Althoff et al., 2014) et cette structure a pu être comparée à la structure en présence de glutamate et d'ivermectine obtenue précédemment (Hibbs & Gouaux, 2011). L'exercice de comparaison entre les différentes structures peut maintenant être réalisé sur le GlyR, le 5-HT₃R et le GABA_AR qui ont tous été résolus dans plusieurs conformations.

Il faut néanmoins rester vigilant dans l'analyse de ces structures qui représentent seulement un aperçu à un instant donné de la conformation de la protéine. Plusieurs limitations existent en cristallographie et en cryo-microscopie et les récepteurs peuvent être contraints dans des conformations qui ne sont pas forcément pertinentes physiologiquement. Les structures en cristallographie sont résolues en présence de détergent, et le TMD n'est pas dans un environnement membranaire. L'empilement cristallin (*packing*) peut entraîner des contacts entre les protéines contraignant la structure. Même si la cryo-microscopie électronique permet d'éviter certaines de ces contraintes, elle présente d'autres limitations. Par exemple, les parties de la protéine qui sont à l'interface air-glace dans la grille peuvent aussi subir des contraintes et l'environnement du TMD en détergent ou nano-disques peut avoir une influence sur la conformation. Pour ces raisons, l'étude des transitions à partir des structures est largement complétée avec différentes approches biophysiques qui ont l'avantage de permettre l'étude des transitions de manière dynamique et d'inclure le domaine intracellulaire qui est totalement ou partiellement manquant dans les structures des RCPs eucaryotes. De nombreuses techniques ont été utilisées pour l'étude des transitions des RCPs, on peut citer parmi d'autres, la modélisation moléculaire, la microscopie par force atomique (AFM), l'utilisation de sondes fluorescentes et paramagnétiques ou encore l'étude des spins nucléaires avec la RMN. Ces études peuvent se faire avec la protéine purifiée en détergent, reconstituée en vésicules ou exprimée en cellules. Chacun de ces systèmes peut induire des

biais dans l'observation des transitions et la combinaison des différentes techniques est nécessaire pour une meilleure compréhension du fonctionnement des RCPs.

Dans l'analyse des transitions détaillée dans la partie suivante, on observe parmi les sous-types de RCPs, une grande conservation des régions de la protéine impliquées dans les différentes transitions d'activation et désensibilisation. On trouve néanmoins certaines spécificités avec des mouvements de moindre amplitude et parfois dans des directions opposées indiquant une certaine spécificité pour chaque classe de récepteur.

Transitions des différents domaines

Transitions de l'ECD

Pour GLIC, la structure à pH 7 représente la conformation dans l'état de repos. À pH 4, on observe une activation maximale du récepteur en électrophysiologie et la structure obtenue dans ces conditions représente l'état actif. On peut d'abord regarder ce qu'il se passe au niveau des réorganisations tertiaires en observant les mouvements à l'échelle d'une sous-unité. La structure à pH 7 comporte 4 pentamères pour lesquels le facteur B, qui est un indicateur de l'agitation thermique en cristallographie, est particulièrement important surtout sur la partie haute de l'ECD indiquant une grande flexibilité. On peut superposer les 20 sous-unités de ces 4 pentamères avec les 5 sous-unités de la structure obtenue à pH 4. Pour les récepteurs eucaryotes, il est possible de comparer les structures du récepteur anionique GlyR $\alpha 1$ dans sa conformation inhibée en présence de strychnine et dans sa conformation active liée à la glycine et l'ivermectine (Du et al., 2015). Le récepteur cationique 5-HT_{3A} a également été résolu dans une conformation inhibée en présence de l'antagoniste tropisetron et dans la conformation active en présence de sérotonine (5-HT) (Polovinkin et al., 2018).

Pour la transition de l'état de repos/inhibé vers l'état actif, on observe au niveau tertiaire des mouvements de *capping* de la boucle C de l'extérieur vers l'axe de symétrie et pour la boucle 2 un mouvement vers le bas en direction du TMD. Ces mouvements sont bien conservés chez les GLIC et GlyR, entre la conformation au repos/inhibé et la conformation active avec une amplitude des mouvements plus faible pour GlyR (Figure 31). Pour le 5-HT_{3R}, ce sont les mêmes boucles qui bougent mais avec une direction différente. On observe également un mouvement de la Cys-loop en bas de l'ECD, qui est plus important pour les récepteurs eucaryotes alors que GLIC voit une réorganisation plus importante de sa boucle B

et du haut de l'ECD de manière générale. Un autre mouvement important, vu principalement sur GLIC, consiste en une compaction à la base du sandwich β de chaque sous-unité.

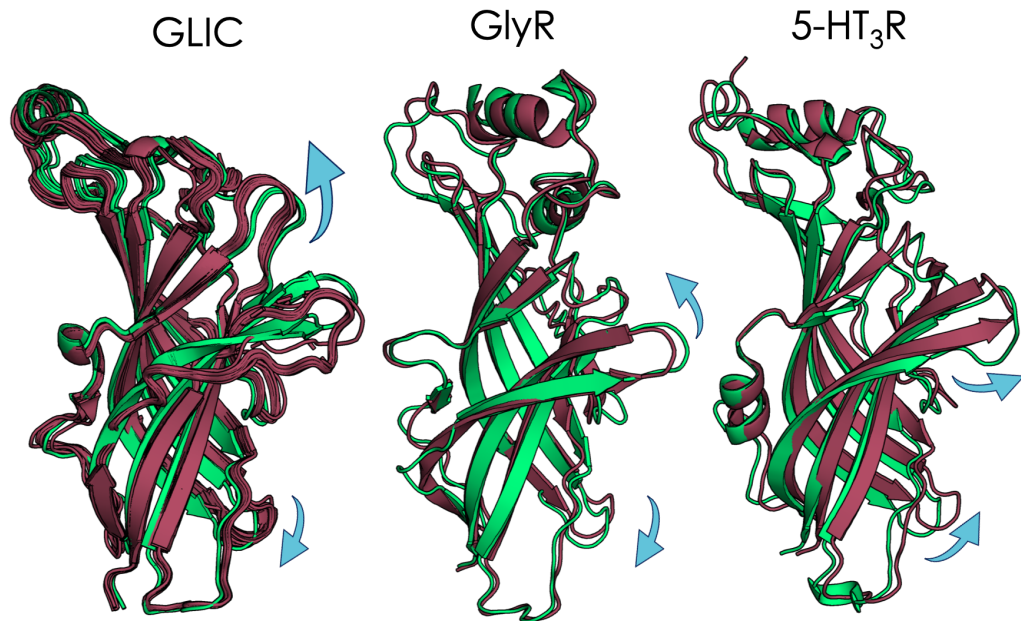
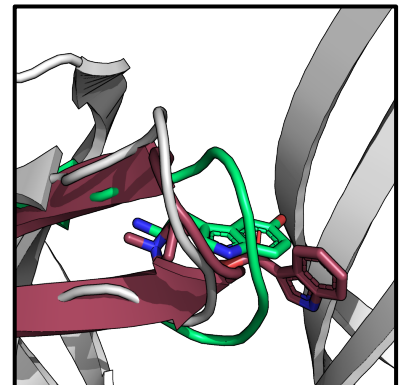


Figure 31. Comparaison des transitions tertiaires des ECD et du capping de GLIC, GlyR et 5-HT₃R. L'état de repos est en rouge et l'état actif en vert, les flèches soulignent les mouvements principaux. Sur GLIC, la réorganisation du haut de l'ECD est importante alors que pour les eucaryotes on observe surtout un mouvement de la base de l'ECD. À droite, le zoom sur la boucle C du 5-HT₃R montre un capping en présence de sérotonine alors que la boucle en présence de tropisetron est dans la même position que dans la structure Apo (sans ligand).



Les RCPs sont des protéines oligomériques et inévitablement, la transition d'activation implique des réorganisations quaternaires. On observe des réorganisations quaternaires majeures sur GLIC entre pH7 et pH 4. À pH7, l'ECD de GLIC est plutôt relâché avec peu de contacts entre les sous-unités et une bonne accessibilité au solvant. Dans la structure à pH 4 on observe une conformation plus rigide avec une augmentation des contacts entre sous-unités. La compaction de l'ECD peut être décomposée en deux mouvements principaux. Le premier mouvement est appelé *un-blooming* (pour l'inverse du mouvement d'éclosion d'une fleur) et implique une compaction tertiaire des sandwichs β accompagné d'un mouvement en direction du centre de symétrie vers l'intérieur du récepteur. La deuxième composante est un mouvement global appelé *twist* qui consiste en une translation parallèle à la membrane en

sens antihoraire de l'ensemble de l'ECD (Figure 32). Avant d'être observés dans les structures, ces différents mouvements avaient pu être prédits par des expériences de modélisation par modes normaux qui calculent les modes de vibrations de la protéine (Taly et al., 2005). La mutation des résidus à l'interface entre sous-unités qui stabilisent l'état fermé au repos, donne une activité spontanée (Taly et al., 2006) et souligne l'importance des interactions inter sous-unité dans les transitions. Des études par AFM suggèrent que les réorganisations de l'ECD ont une amplitude plus importante que celles observées dans les structures avec une augmentation du diamètre du vestibule (2 à 2,8 nm) alors qu'une légère diminution est visible dans les structures (de 2,6 à 2,1 nm) (Ruan et al., 2018).

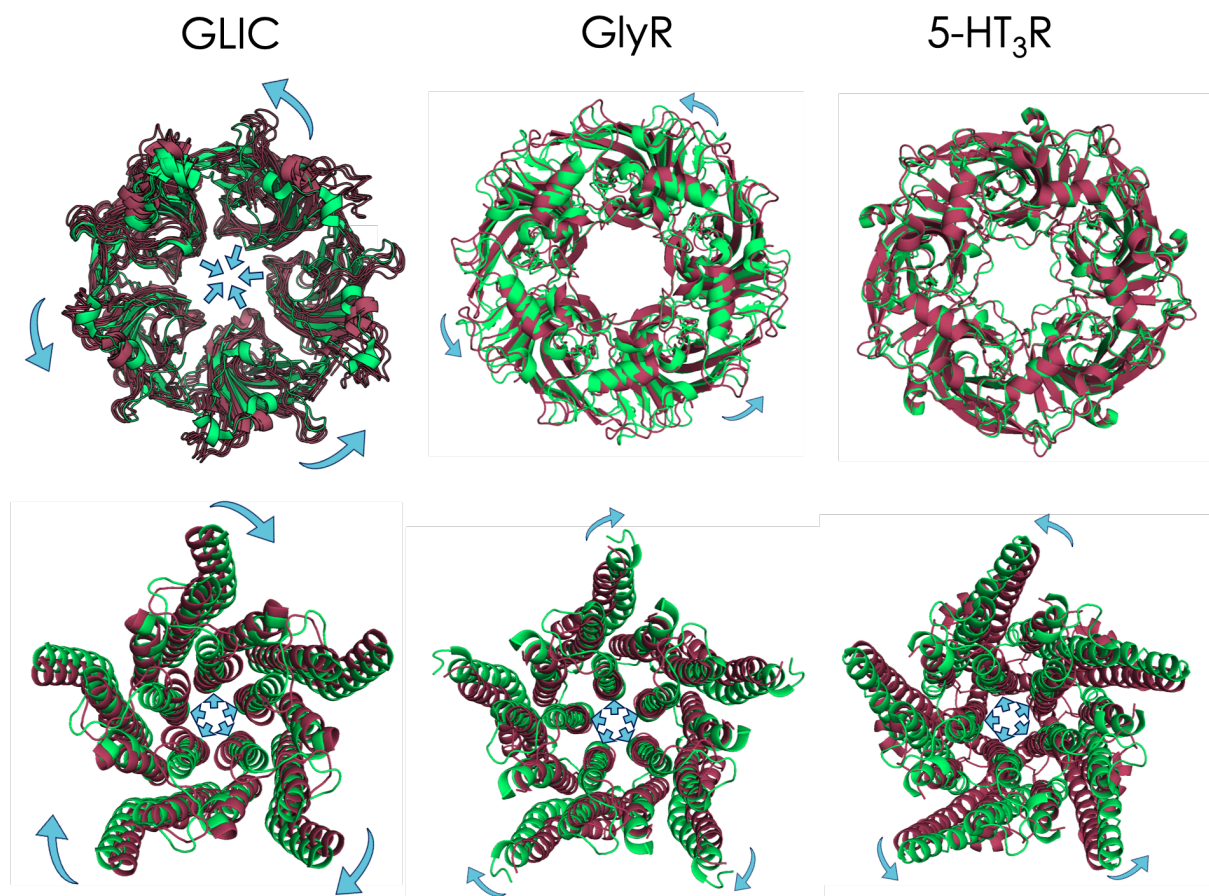


Figure 32 Transitions quaternaires au niveau de l'ECD et du TMD. L'état de repos est présenté en rouge et actif en vert. On observe pour GLIC le un-blooming de l'ECD et le twist qui est dans des directions opposés entre le TMD et l'ECD. Le un-blooming est de plus faible amplitude pour GlyR et non visible sur le haut de l'ECD de 5-HT₃R. Le haut des hélices M2 bouge vers l'extérieur pour les trois récepteurs.

Chez les eucaryotes les structures indiquent des mouvements quaternaires de plus faible amplitude. Sur le GlyR, on voit tout de même une composante de *twist* mais le *un-*

blooming n'est pas évident visuellement. Pour le 5-HT₃R, les différences en haut de l'ECD sont très faibles et les réorganisations quaternaires semblent plutôt concerner le bas de l'ECD avec un mouvement vers l'intérieur et vers le haut des boucle F et Cys-loop qui modifie les interactions aux interfaces. Sur le GlyR on observe également un mouvement en bas de l'ECD mais le mouvement de la Cys-loop a une amplitude plus faible et dans la direction opposée au 5-HT₃R. Des études à l'aide de sondes fluorescentes n'ont pas mesuré de réorganisations majeures de l'ECD entre état actif et désensibilisé (Akk & Steinbach, 2011; Q. Wang & Lynch, 2011).

Réorganisation du site orthostérique dans l'activation

La réorganisation du site orthostérique implique deux mouvements majeurs, un rapprochement quaternaire des deux parties de l'interface inter sous-unité et un mouvement de fermeture du site par la boucle C, le *capping*. Ces mouvements impliquent la réorganisation d'acides aminés clés pour la reconnaissance du ligand et qui ont un rôle critique dans la différence d'affinité des ligands pour les différents états allostériques définissant ainsi leur nature d'agoniste partiel, total ou d'antagoniste compétitif. Dans les études initiales sur l'AChBP, les réorganisations quaternaires n'étaient pas significatives et il avait été proposé que le mouvement de *capping* de cette boucle C était le déterminant de la reconnaissance du ligand. Dans les co-structures résolues, le *capping* n'avait pas eu lieu pour les molécules antagonistes présentant un volume stérique important alors que le *capping* s'était produit pour les molécules agonistes plus petites (Bourne, Talley, Hansen, Taylor, & Marchot, 2005; Celie et al., 2004). L'hypothèse a également été émise que ce mouvement était le déterminant du *priming* des récepteurs nicotiques (Mukhtasimova et al., 2009). Sur le 5-HT_{3A}R et le GlyR, on observe effectivement le *capping* en présence d'agoniste, alors que les structures en présence d'antagoniste et Apo pour 5-HT₃R ont toutes les deux la boucle qui n'est pas refermée sur le site orthostérique. Cependant on observe également le mouvement de *capping* pour GLIC alors que le site de sensibilité au proton n'est a priori pas dans le site orthostérique. Chez ELIC, la boucle C qui est plus grande augmente en flexibilité en présence d'agoniste (Schmandt et al., 2015) alors que le mouvement de *capping* est observé en présence de l'antagoniste acétylcholine (Pan et al., 2012). Par des études en fluorescence des changements de conformation différents ont été observés au niveau de ce site avec un agoniste total ou partiel (Pless & Lynch, 2009c). Mais il est parfois difficile de différencier les

changements de fluorescence dus à la liaison de l'agoniste ou à un changement de conformation. On ne peut donc pas exclure que le mouvement de la boucle C soit une conséquence de l'activation et que son *capping* aurait lieu de concert avec le mouvement des brins 9 et 10 qui la prolonge.

Il est d'avantage vraisemblable que les réorganisations quaternaires de rapprochement de la cage aromatique constituée des résidus des faces principale et complémentaire jouent un rôle primordial dans la l'affinité des ligands. Le rapprochement des sous-unités serait favorisé par les agonistes et ce mouvement serait transmis au reste de l'ECD. Peu d'informations sont disponibles sur les réorganisations de l'ECD pendant la désensibilisation et la nature des déterminants de la plus haute affinité pour l'agoniste pour cet état reste une question ouverte.

TMD dans l'activation et la désensibilisation

Au niveau du TMD de GLIC entre pH 7 et pH 4, l'activation voit une réorganisation majeure au niveau de l'hélice M2 qui borde le canal (Figure 32). La moitié haute de l'hélice à partir du point de constriction en 9' effectue un mouvement d'inclinaison vers l'extérieur appelé *tilt*. L'hélice M2 se rapproche alors de M3 de M1 de la sous unité adjacente. Ce mouvement de courbure est plus léger mais concerne aussi M1. Les autres hélices ont un mouvement de *twist* qui est dans le sens inverse de celui de l'ECD. En AFM, le mouvement du TMD est mesuré indirectement par l'augmentation des distances inter-pentamères et suggère un évasement des hélices M3 et M4 pendant l'activation (Ruan et al., 2018). Pour le GlyR et le 5-HT₃R, les mouvements du TMD sont similaires, avec un *tilt* de M2 et un mouvement de *twist* qui a une amplitude plus faible que sur GLIC. Chez 5-HT₃R, le *twist* a lieu dans le sens de rotation inverse.

Sur GLIC, les chaînes latérales orientées vers l'axe du canal forment des points de constriction. À pH 7, on voit le point de constriction hydrophobe au niveau des isoleucines en 9' et 16' (Figure 33), qui forment une constriction (ou portail hydrophobe) qui empêche la perméation des ions et même des molécules d'eau. Le *tilt* de M2 dans l'état actif voit un élargissement du diamètre du canal à ce niveau et donc une levée de la barrière hydrophobe, ce qui est cohérent avec un état perméant ouvert. Le mouvement de ces résidus hydrophobes est une barrière énergétique clé pour l'activation des RCPs et la mutation de ces résidus pour des résidus plus polaires entraîne un gain de fonction (Bocquet et al., 2007). Pour les

récepteurs eucaryotes, la transition entre repos et actif implique également une levée de la constriction hydrophobe en 9'-16'. Contrairement à GLIC, on voit sur GlyR que le bas de M2 est également impacté par le mouvement de *tilt*.

Chez GLIC la désensibilisation n'est pas clairement visible par électrophysiologie et fait toujours débat. Néanmoins des études par RPE de GLIC en liposomes indiquent que le portail de désensibilisation serait plus bas dans le canal que celui d'activation et impliquerait les résidus polaire en dessous de la constriction hydrophobe (Velisetty & Chakrapani, 2012; Velisetty, Chalamalasetti, & Chakrapani, 2012). Chez les eucaryotes, la désensibilisation est mieux caractérisée et a été étudiée par différentes méthodes en électrophysiologie, *stopped-flow* et par des expériences de photo-marquage. Ces études ont permis de voir que la désensibilisation chez les nAChR était bi-phasique avec une composante rapide dans la gamme de 10-100 msec suivie d'une plus lente de la gamme de 1 à 60 secondes et que ces deux états avaient des conformations distinctes (Yamodo, Chiara, Cohen, & Miller, 2010). Une hypothèse pour expliquer ces phases serait la présence de réorganisations distinctes. La phase rapide de désensibilisation impliquerait des réorganisations au niveau du canal et la composante plus lente impliquerait des mouvements au niveau de la boucle M2M3 et de l'interface entre les hélices M1-M4. Une autre explication pour expliquer la présence de ces deux phases de désensibilisation serait une asymétrie transitoire pendant le mouvement de fermeture du canal par les différentes sous-unités.

L'étude des réorganisations entre l'état actif et désensibilisé à partir des structures est délicate car il faut s'assurer de l'assignement correct des conformations résolues. Par exemple, la structure de GlyR $\alpha 1$ en présence de glycine + ivermectine avait au départ été assignée à un état de faible conductance ou désensibilisé et la structure résolue en présence de glycine seulement a été assignée à l'état actif (Du et al., 2015). Une étude par dynamique moléculaire de la structure en présence de glycine indique qu'une telle conformation ne serait pas physiologiquement pertinente aux vues de sa perméabilité trop importante aux différents ions et que la structure en présence de glycine + ivermectine serait plus représentative de l'état actif (Cerdan, Martin, & Cecchini, 2018). Le consensus est d'avantage établi pour la structure de GlyR $\alpha 3$ en présence du modulateur AM-3607 qui représenterait un état désensibilisé comme la structure de récepteur GABA_AR $\beta 3$. En comparaison avec l'état actif, le GlyR désensibilisé a un TMD similaire à celui de l'état actif. La différence principale se trouve en bas des hélices M3 et M4 ainsi que sur le bas de l'hélice M2.

Perméation du canal

Dans l'état ouvert c'est le filtre de sélectivité en bas du canal en -2'/2' qui devient le point de constriction principal, avec cependant un diamètre du canal suffisant pour le passage des ions sous forme totalement ou partiellement hydratée. Dans une structure de GLIC à haute résolution deux pentagones de molécules d'eau sont présents en 6' et -2' et joueraient un rôle important dans le mécanisme de perméation des ions. Il semble que la chaîne latérale de la sérine en 6' se réoriente et participe activement au passage des ions (Sauguet, Poitevin, et al., 2013).

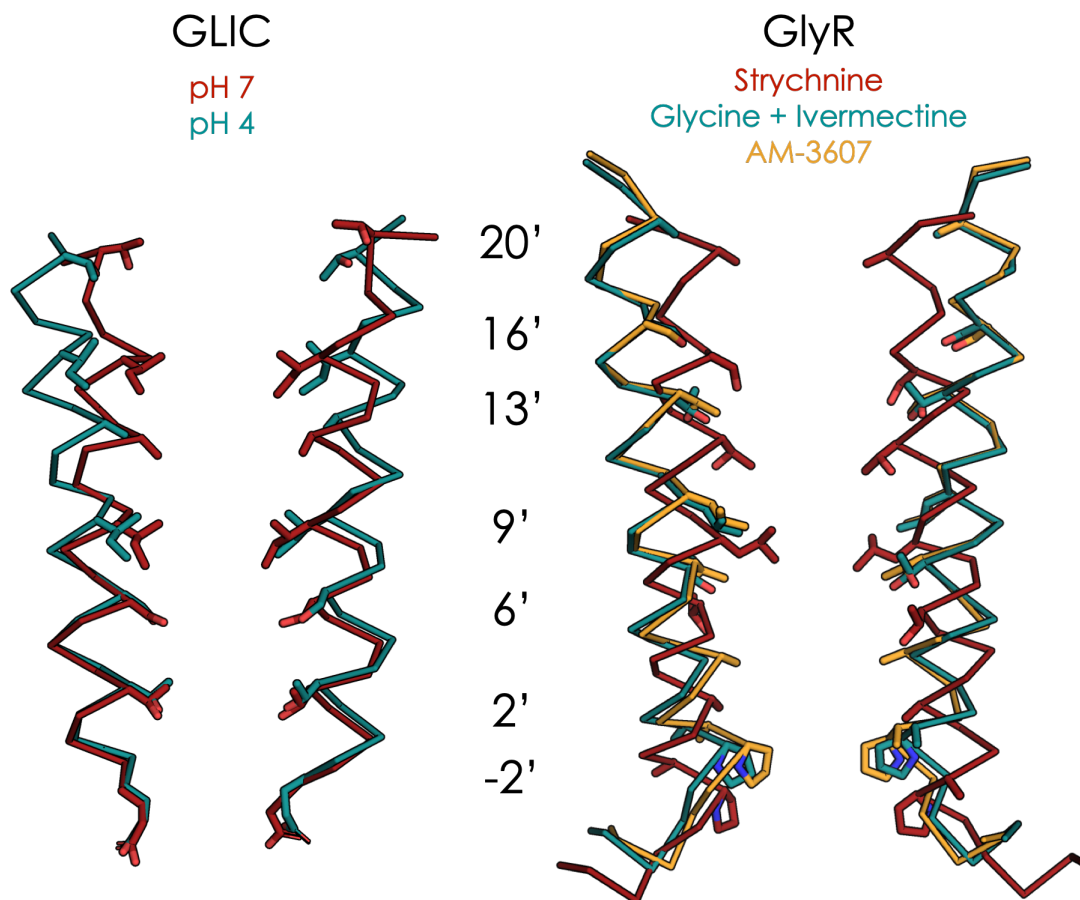


Figure 33. Profil du canal de GLIC et GlyR. Superposition des hélices M2 de deux sous-unités non adjacentes qui viennent des différentes structures au repos (rouge), et des états actif (vert) et désensibilisé (orange). Les chaînes latérales des résidus formant le canal sont représentées en bâtons.

Pour les récepteurs eucaryotes, la transition entre repos et actif implique également un réarrangement de la constriction hydrophobe en 9'-16'. À la différence de GLIC, on voit sur le GlyR, que le bas de M2 est impacté pour le mouvement de *tilt*.

En ce qui concerne la désensibilisation, plusieurs études avaient suggéré un mécanisme de réorganisation du canal avant que l'on puisse l'observer dans les structures. Sur les nAChR, il avait été suggéré assez tôt à l'aide d'études en canal-unique que le portail de désensibilisation était différent de celui d'activation (Auerbach & Akk, 1998), et des études par mutagenèse d'accessibilité des cystéines ont également montrés différents niveaux de constriction du canal (Akabas, Stauffer, Xu, & Karlin, 1992). Sur le GABA_AR et le GlyR, plusieurs mutations dans la partie basse du canal en -2'/2' ont été identifiées pour avoir un impact fonctionnel sur la désensibilisation alors que leur effet est limité sur l'activation. Comme la picrotoxine se lie à cet endroit (Hibbs & Gouaux, 2011), on peut s'attendre à ce qu'elle ait un effet sur la désensibilisation. L'observation d'un courant de rebond après application de ce bloquants du canal dû au retour des canaux de l'état désensibilisé vers actif a permis de situer ce portail de désensibilisation en bas du canal, au niveau du filtre de sélectivité en -2'/2' (Gielen, Thomas, & Smart, 2015). D'après les structures de GlyR en présence de AM-3607, on peut voir que le profil du canal est assez similaire à celui de l'état actif. On voit effectivement que la différence principale se trouve au niveau du filtre de sélectivité. La constriction en P-2' et G/A2' est plus importante que dans l'état actif et le diamètre ne permet plus le passage des ions.

Mouvements de couplage à l'interface ECD-TMD

Un des mouvements les plus importants à l'interface entre les deux domaines ECD et TMD est probablement le mouvement de rotation vers l'extérieur de la boucle M2M3. Ce mouvement est concerté avec le haut de l'hélice M2 lors du *tilt* qui ouvre le canal. Certaines chaînes latérales de cette boucle M2M3 opèrent un large réarrangement créant de nouvelles interactions qui stabilisent l'état actif. Comme c'est le cas par exemple de la leucine (L246 pour GLIC) qui dans plusieurs RCPs interagit avec le TMD dans l'état Apo ou lié à un antagoniste et interagit avec la Cys-loop de l'ECD dans l'état actif. La proline adjacente (P247 pour GLIC) est elle aussi très conservée et semble stabiliser l'état actif par une interaction avec la boucle 2. Le segment Pre-M1 est plutôt rigide et agit comme un pivot en interagissant avec la boucle M2M3 et la Cys-loop. Une autre interaction qui semble être critique dans la transition de GLIC est l'interaction électrostatique formée par l'aspartate D32 et l'arginine R192 qui font partis des boucles 2 et Cys-loop (Lev et al., 2017). Une étude de mutagenèse systématique des résidus à l'interface ECD-TMD sur GLIC et ELIC laisse penser que les

interactions du pre-M1 ; des boucles M2-M3 et de $\beta 1$ - $\beta 2$ avec la boucle $\beta 6$ - $\beta 7$ sont critiques pour l'activation (Bertozzi, Zimmermann, Engeler, Hilf, & Dutzler, 2016). En RPE sur GLIC, il semble qu'en plus du mouvement vers l'extérieur de la boucle M2M3, la boucle F bouge vers l'intérieur du vestibule (Dellisanti et al., 2013).

Chez les membres eucaryotes des RCPs, le mouvement de la boucle M2M3 vers l'extérieur entre les structures au repos et dans l'état actif est similaire à celui observé sur GLIC. Sur le GlyR, des études par fluorescence au niveau de l'interface entre les sous-unités suggèrent qu'une réorganisation a lieu à ce niveau pendant la désensibilisation (Q. Wang & Lynch, 2011).

Caractérisation structurale d'intermédiaires de l'activation

Un intermédiaire de GLIC localement fermé

Parmi les différentes structures résolues, certaines ne correspondent pas à un état actif, au repos ou désensibilisé mais seraient des conformations intermédiaires entre ces états. En particulier, une conformation intermédiaire de GLIC qui a été révélée par cristallographie est appelée *locally-closed* (LC) (Prevost et al., 2012). Dans cette conformation l'ECD a une conformation similaire à celle à pH4 et le canal est fermé de manière similaire à la conformation à pH7. La boucle M2M3 a une position différente plutôt proche de l'état actif ou au repos selon les mutants cristallisés. Cet état pourrait correspondre à un état pré-actif mais la question se pose de savoir s'il est représentatif d'un état physiologique. En effet cette conformation a d'abord été obtenue avec différentes mutations au niveau de l'interface ECD-TMD. Pour contraindre le LC, des cystéines ont été introduites à l'interface entre le haut de M2 et le début de la boucle M2M3 avec la boucle 2 de l'ECD afin de contraindre un état fermé, l'objectif d'origine étant d'obtenir un état fermé dans les conditions de cristallisation à pH4. Néanmoins d'autres structures GLIC en LC ont pu être obtenues par cristallographie avec de simples mutations qui donnent des récepteurs fonctionnels (Hu, Ataka, et al., 2018). Ces différentes structures ont comme majeure différence le mouvement de la boucle M2M3 plus ou moins reculée vers la position de l'état actif. Une structure en présence de DHA donne une conformation proche du LC avec la boucle M2M3 qui a bougé de manière significative (Basak et al., 2017). Pour conforter les observations d'état pré-actif, il est important de regarder en

parallèle les transitions en dehors des conditions cristallines qui peuvent fortement contraindre la conformation.

Caractérisation d'un état pré-actif de GLIC

En parallèle de ces structures, des études par fluorescence ont été développées au sein du laboratoire, en utilisant l'approche de quenching par les tryptophanes (Mansoor, Mchaourab, & Farrens, 2002). Ces travaux ont permis de montrer des changements de conformations à différents niveaux de GLIC pendant l'activation (Menny et al., 2017).

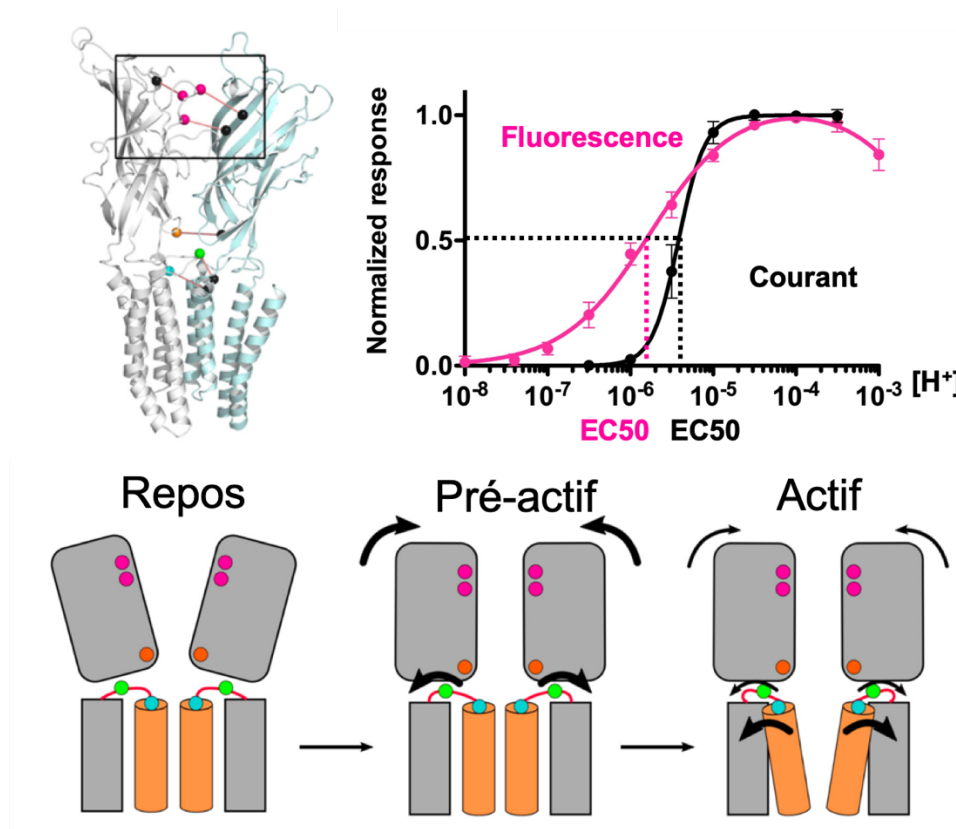


Figure 34. Caractérisation d'un état pré-actif. Sur la structure de GLIC, en rose les senseurs du haut de l'ECD, en orange celui du bas de l'ECD, en vert le senseur de la boucle M2M3 et en bleu celui du haut de M2. Les quenchers sont représentés par des sphères noires. Le graphique montre la différence d'EC₅₀ en fluorescence et en courant et le schéma caractérise l'activation de GLIC avec la plupart des changements de conformation entre repos et pré-actif, il reste ensuite le mouvement de tilt de M2 pour ouvrir le canal (Menny et al., 2017).

Cette approche décrite dans la partie suivante permet d'observer des changements de distances entre deux positions sur le récepteur qui sont proches autour de 10 Å entre les carbones α des acides aminés. 6 positions à différents niveaux de la protéine ont été utilisées : 3 en haut de l'ECD au niveau de l'interface entre sous-unités, 1 en bas de l'ECD, 1 sur la boucle M2M3 et enfin une dernière sur le haut de M2. Ces senseurs fluorescents rapportent la

compaction du domaine extracellulaire pendant l'activation et le mouvement vers l'extérieur de la boucle M2M3. Les changements de conformation mesurés par fluorescence en protéine purifiée ont lieu à des concentrations plus faibles en proton que l'activation (Figure 34) et ont des cinétiques plus rapides que l'activation en électrophysiologie. Ces résultats indiquent donc qu'un état pré-actif apparaît rapidement dans la transition vers l'état actif et la majorité des réorganisations de l'ECD et de la boucle M2M3 entre l'état repos et actif se sont déjà produites avant l'étape d'ouverture du canal.

Vers la caractérisation de familles de conformations

Diverses approches biophysiques ont été développées pour regarder les transitions entre états des RCPs. En effet les observations venant de la cristallographie et de la microscopie par force atomique montrent que l'état au repos est caractérisé par une large variabilité structurale de l'ECD alors que l'état actif adopte une conformation plus rigide. La structure de GLIC à pH 7 montre une variabilité de structure entre les quatre pentamères de la maille cristalline, et les images d'AFM sont relativement floues à pH 7 en comparaison avec les images plus nettes à pH 4 pour lesquels la conformation des récepteurs semble être plus rigide (Ruan et al., 2018; Sauguet et al., 2014). On peut spéculer que l'entropie de l'état actif soit plus faible que celle de l'état au repos.

En particulier la compaction de la boucle C est très variable et elle commence à se fermer sur certains monomères laissant supposer un début de pré-activation. De manière générale, ces fluctuations indiquent dans quels directions les changements conformationnels peuvent avoir lieu pour arriver aux intermédiaires de la pré-activation. En accumulant les structures d'intermédiaires et en les combinant avec les autres techniques de biophysique, on obtiendrait alors un paysage conformationnel où un état fonctionnel serait représenté par une famille de conformations.

Conservation des transitions des RCPs

Conservation des transitions entre procaryotes et eucaryotes

Globalement les transitions des RCPs sont conservées entre les différents sous-types eucaryotes et procaryotes. Une compaction du site orthostérique et des interfaces de l'ECD ainsi qu'un mouvement de la boucle M2M3 sont retrouvés chez les différents RCPs. Les mécanismes d'ouverture du canal et le mouvement des hélices M2 ont aussi l'air d'être

conservés avec des différences notables entre RCPs anioniques et cationiques. Cependant, l'approfondissement des connaissances sur les transitions des RCPs tend à souligner des différences entre les différents types. Les mouvements de *unblooming* sont beaucoup plus marqués chez les procaryotes et le mouvement principal de l'ECD semble se situer au niveau de l'interface ECD-TMD avec un élargissement de l'espace inter sous-unités. Le TMD semble aussi assez flexible chez les eucaryotes ce qui est cohérent avec une pharmacologie plus riche que chez les procaryotes à ce niveau. En comparant les ECD des différents RCPs, une étude suggèrent que les RCPs eucaryotes ont évolués pour avoir un sandwich β plus flexible et relâché qui permettrait de faciliter l'activation (Dellisanti, Hanson, Chen, & Czajkowski, 2011). L'étude de la chimère ELIC-GLIC par RPE montre que les chemins d'activation seraient distincts entre l'activation par le pH et le GABA (Schmandt et al., 2015). Il est donc important de développer les études sur les RCPs eucaryotes pour comprendre les subtilités de leurs mécanismes, mais compte-tenu de la grande conservation d'une partie de ces caractéristiques chez les procaryotes il est aussi intéressant de continuer à utiliser ces récepteurs comme modèle des RCPs eucaryotes. De plus, l'expression à grande échelle et la purification des RCPs eucaryotes reste encore un défi de taille pour développer certaines approches biophysiques. Compte-tenu de la robustesse des RCPs procaryotes en termes de niveau d'expression dans différents systèmes, de la facilité d'isolement par purification et de leur résilience aux mutations, ces récepteurs constituent un modèle d'étude idéal et permettent de développer de nouvelles approches pour révéler les mécanismes d'action de ces protéines.

Altération des transitions par des mutations pathologiques et modulateurs

De nombreuses mutations avec un effet sur la fonction ont été identifiées. Il est possible de les caractériser par électrophysiologie afin d'évaluer leur effet par exemple sur la modification de la sensibilité pour l'agoniste, de la cinétique ou encore de la conductance. Ces mutations sont particulièrement localisées dans le domaine transmembranaire, à l'interface entre sous-unité ou bien à l'interface entre domaines ECD et TMD d'une même sous-unité (Taly & Changeux, 2008). Il est probable que ces mutations affectent des étapes clés des transitions en les limitant ou en les modifiant et il est probable que les modulateurs puissent avoir des effets similaires.

Mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents via des études de dynamique conformationnelle permettrait de mieux comprendre l'effet des mutations et

modulateurs sur la structure et les transitions. Cela pourrait aider à la meilleure compréhension des mécanismes d'action des canalopathies et à la conception de nouveaux modulateurs spécifiques. Les approches par fluorescence semblent être bien adaptées à ces problématiques d'étude de dynamiques conformationnelles.

L'apport de la fluorescence pour l'étude dynamique des protéines membranaires

Les approches par fluorescence ont permis des grandes avancées dans l'étude des protéines de manière générale et semblent être des approches de choix pour l'étude des RCPs. Avant de détailler cet aspect il est nécessaire d'introduire quelques notions sur ce phénomène physique.

Principes physiques de la fluorescence

L'absorption de photons par une molécule l'amène dans un état électronique excité. Plusieurs mécanismes sont alors possibles pour libérer l'énergie emmagasinée et permettre le retour à un état non-excité. Cette désexcitation est possible par conversion interne ou relaxation vibrationnelle (émission de chaleur) ou bien avec la libération d'énergie par émission de photon. La relaxation par émission de photons appelé luminescence, peut donner soit de la phosphorescence si elle se fait sur des temps longs et via un état intermédiaire dit triplet peuplé lors changement du spin de l'électron, soit de la fluorescence si elle se fait sur des temps plus courts et sans passer par un l'état triplet (Figure 35). Ce phénomène est très rapide dans la gamme de la dizaine de nanosecondes mais le temps de vie de l'état excité dépend de la molécule fluorescente et des conditions (Lakowicz, 2006).

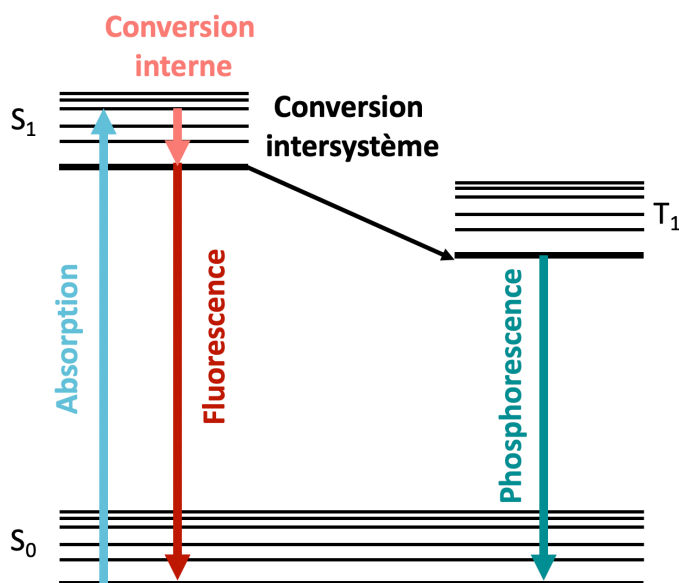


Figure 35. Diagramme de Jablonski.
 S_0 représente l'état énergétique d'un électron non excité avec les différents niveaux d'énergie vibrationnelles. Avec l'absorption d'un photon, l'électron passe au niveau d'énergie S_1 , il peut alors se désexciter en émettant de la fluorescence ou de la phosphorescence s'il passe dans un état triplet T_1 .

De nombreuses molécules sont fluorescentes et doivent pour cela contenir des électrons facilement excitables, c'est-à-dire avoir une différence d'énergie faible entre leur orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) et celle inoccupée de plus basse énergie (LUMO). C'est le cas des molécules contenant des cycles aromatiques qui ont une faible énergie de transition entre état excité et non-excité. Pour exciter les électrons il faut apporter une quantité d'énergie particulière qui dépend de la nature des molécules, l'énergie apportée par le photon n'est jamais réémise dans sa totalité et la longueur d'onde d'émission est donc plus grande (plus faible en énergie). Ce phénomène appelé déplacement de Stokes est dû aux différents niveaux vibrationnels des électrons qui font perdre de l'énergie à l'électron excité par relaxations vibrationnelles. Compte tenu de ces différents niveaux, une gamme de longueur d'onde peut être utilisée pour exciter un fluorophore particulier et donne un spectre d'émission qui est en général le miroir de celui d'excitation, mais il existe néanmoins une longueur d'onde qui correspond au maximum d'excitation et qui va donner l'intensité maximale d'émission (Figure 36).

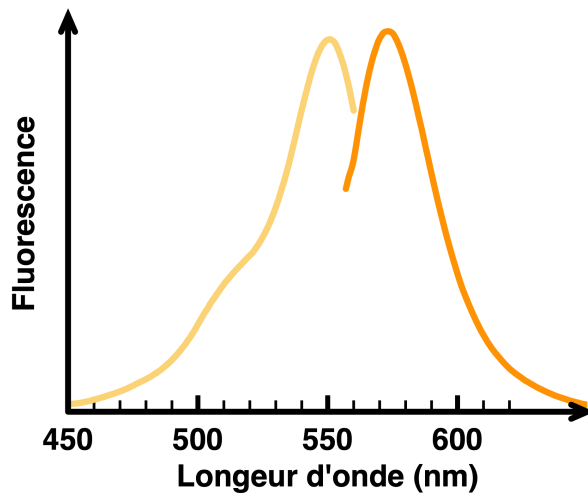


Figure 36. Spectre d'émission et d'excitation. Exemple du spectre d'excitation (jaune) et d'émission (orange) du fluorophore TAMRA qui présente des maximums à 550 et 575 nm en solution aqueuse.

Pour un fluorophore donné, de nombreux phénomènes peuvent donner des relaxations non-radiatives et plusieurs paramètres peuvent faire varier l'intensité de fluorescence et les longueurs d'ondes maximum d'émission et d'excitation. Chaque fluorophore est caractérisé par sa brillance qui est elle-même la combinaison de deux facteurs :

- Le coefficient d'absorption ϵ qui définit la capacité de la molécule à absorber les photons.
- Le rendement quantique Φ qui est décrit par l'efficacité de la molécule à émettre de la fluorescence à partir de l'état excité.

La brillance est calculée pour une longueur d'onde d'excitation et pour des conditions données. Le spectre d'excitation est relativement stable mais celui d'émission peut changer selon certains paramètres environnementaux (Figure 37). Les caractéristiques de certains fluorophores sont exploitées et il est possible de s'en servir comme senseur des conditions environnementales telles que le pH, la concentration en ions ou le potentiel membranaire.

Parmi les paramètres qui font varier la fluorescence, on peut noter :

- La nature du solvant. En créant des interactions dipole-dipole avec le fluorophore, un solvant polaire va stabiliser l'état excité en diminuant son énergie et induire un décalage du spectre d'émission vers les plus grandes longueurs d'ondes (*red shift*).
- La viscosité. En limitant les mouvements de rotations internes du fluorophore la viscosité limite les relaxations non-radiatives et ainsi va augmenter le rendement quantique.

- La température. Par le même mécanisme que la viscosité, la température va aussi avoir un effet sur la fluorescence et en générale une température basse va limiter les mouvements moléculaires et l'émission d'énergie de manière non radiative.
- Le pH. Lorsque les molécules sont protonables, le pH peut aussi affecter l'émission de fluorescence.
- Les interactions intermoléculaires. Certaines molécules (quencheres), si elles interagissent avec le fluorophore vont avoir pour effet d'éteindre ou de diminuer l'intensité de fluorescence. Ce phénomène peut avoir lieu via des interactions qui augmentent les relaxations non-radiatives, par exemple le quenching collisionnel augmente les relaxations vibrationnelles. Le quenching peut aussi être induit par la formation de complexes non-radiatifs, ou le transfert d'électrons ou de photons.

De manière générale les paramètres faisant varier la fluorescence sont multiples et il est parfois difficile de connaître la cause d'une variation de fluorescence ou de déplacement de Stokes ou bien de prédire l'effet que va avoir le changement d'un paramètre. Les variations de ces paramètres sont d'autant plus difficiles à appréhender au sein d'un système biologique où les conditions peuvent varier localement. Néanmoins, de nombreux outils et méthodes faisant intervenir la fluorescence ont été développés pour l'étude des protéines.

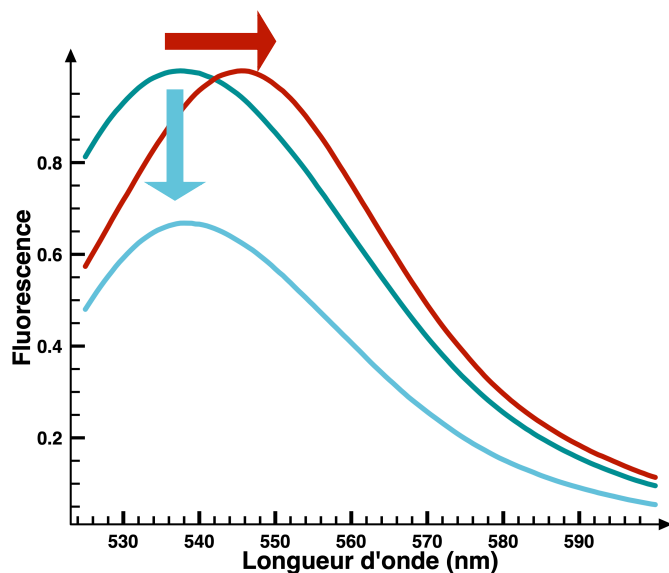


Figure 37. Effet sur l'intensité de fluorescence et le maximum de longueur d'onde. Exemple d'un spectre d'émission, normalisé (vert) si l'environnement devient moins hydrophobe on peut voir un décalage du maximum de longueur d'onde (red shift en rouge) ou une diminution de l'intensité de fluorescence (quenching en bleu).

Les outils fluorescents à disposition

La fluorescence étant un phénomène très rapide et sensible à l'environnement, elle est devenue une approche de choix pour l'étude des systèmes biologiques. On peut classer en deux grands groupes les molécules qui peuvent être utilisées pour l'étude des protéines membranaires : les protéines et les molécules fluorescentes.

Les protéines fluorescentes (FP) sont présentes chez bons nombres d'organismes, notamment chez les animaux marins. La découverte de la GFP (*Green Fluorescent Protein*) chez la méduse *Aequorea victoria* dans les années 60 et son clonage en 1992 a révolutionné les approches de fluorescence pour la biologie en donnant la possibilité d'encoder génétiquement une sonde fluorescente. La molécule fluorescente est présente à l'intérieur du tonneau beta formé par la protéine. Ce fluorochrome est formé par autocatalyse de trois chaînes latérales de glycine, sérine et tyrosine. La compréhension du mécanisme de fluorescence de la GFP a permis un développement intensif pour créer par mutagenèse des variantes comportant différentes caractéristiques. La gamme de protéines fluorescentes disponible couvre maintenant tout le spectre du visible et a limité le développement d'autres protéines fluorescentes (Tsien, 2009).

Les molécules fluorescentes elles aussi sont de natures très diverses (Figure 38) et la chimie de synthèse a permis de fournir une grande gamme de dérivés de ces molécules ayant différentes tailles, longueurs d'ondes d'excitation/émission et brillances (Lavis & Raines, 2008). Pour que les molécules fluorescentes synthétiques soit liées aux protéines membranaires, un groupement réactif est rajouté à la molécule. Le plus souvent il s'agit d'un groupement maléimide, méthaneithiosulfonate (MTS) ou iodoacétamide qui va réagir avec les groupements thiol (-SH) des cystéines. Cette approche présente l'inconvénient de limiter le choix de la position de marquage de fluorophore qui doit être accessible. Une alternative qui est en train de se développer est l'incorporation d'acide aminés non-naturels fluorescents qui permet l'encodage génétique de petites molécules fluorescentes.

Deux phénomènes néfastes à l'utilisation de la fluorescence peuvent intervenir avec une excitation répétée des molécules : un phénomène de photoblanchiment (*photobleaching*) et un phénomène d'intermittence (*blinking*). Lorsque l'électron est excité, il peut passer dans un état triplet où il peut réagir avec des radicaux libres, le plus souvent issus des espèces réactives de l'oxygène et forme de manière irréversible une espèce qui n'est plus

capable d'émettre de la fluorescence, c'est le photoblanchiment. Lors du *blinking*, la molécule fluorescente passe dans un état « *dark* » où elle n'émet plus de fluorescence, ce phénomène est réversible mais est très imprévisible en termes de durée et peut poser problème pour certaines applications entre autres pour les approches de fluorescence en molécule unique. Aujourd'hui la recherche pour l'optimisation des fluorophores est toujours très importante et vise à augmenter leur brillance et leur stabilité par rapport à ces deux phénomènes de *photobleaching* et *blinking* (Ha & Tinnefeld, 2012).

La fluorescence comme rapporteur des changements de conformation

Du fait de la rapidité du phénomène physique de fluorescence de l'ordre de quelques nanosecondes, cet outil est bien adapté à l'étude des systèmes biologiques qui ont des dynamiques plutôt de l'ordre de la microseconde pour les canaux ioniques (Shapovalov & Lester, 2004). L'approche la plus simple pour étudier les protéines par fluorescence est de regarder la fluorescence des acides aminés qu'elle contient. En effet les tryptophanes, et dans une moindre mesure les tyrosines et phénylalanines sont fluorescents et leur intensité et longueur d'onde maximale vont varier selon le repliement, les changements de conformations et les interactions intermoléculaires (Lakowicz, 2006). Cette utilisation de la fluorescence des tryptophanes est possible seulement si le nombre de tryptophanes est limité dans la protéine, ce qui n'est pas le cas des RCPs. Une autre possibilité est de regarder les changements de fluorescences de senseurs synthétiques liés à la protéine sur les cystéines par exemple. Cette technique s'applique bien aux RCPs et a largement été utilisée. Dans le cas des tryptophanes ou des fluorophores sur cystéines, un inconvénient notable est la difficulté d'interprétation du changement de fluorescence observé du fait du nombre important de phénomènes qui peuvent en être la cause. Des approches qui utilisent des propriétés particulières des fluorophores ont alors été développées pour extraire d'avantage d'informations à partir des données issues de la fluorescence.

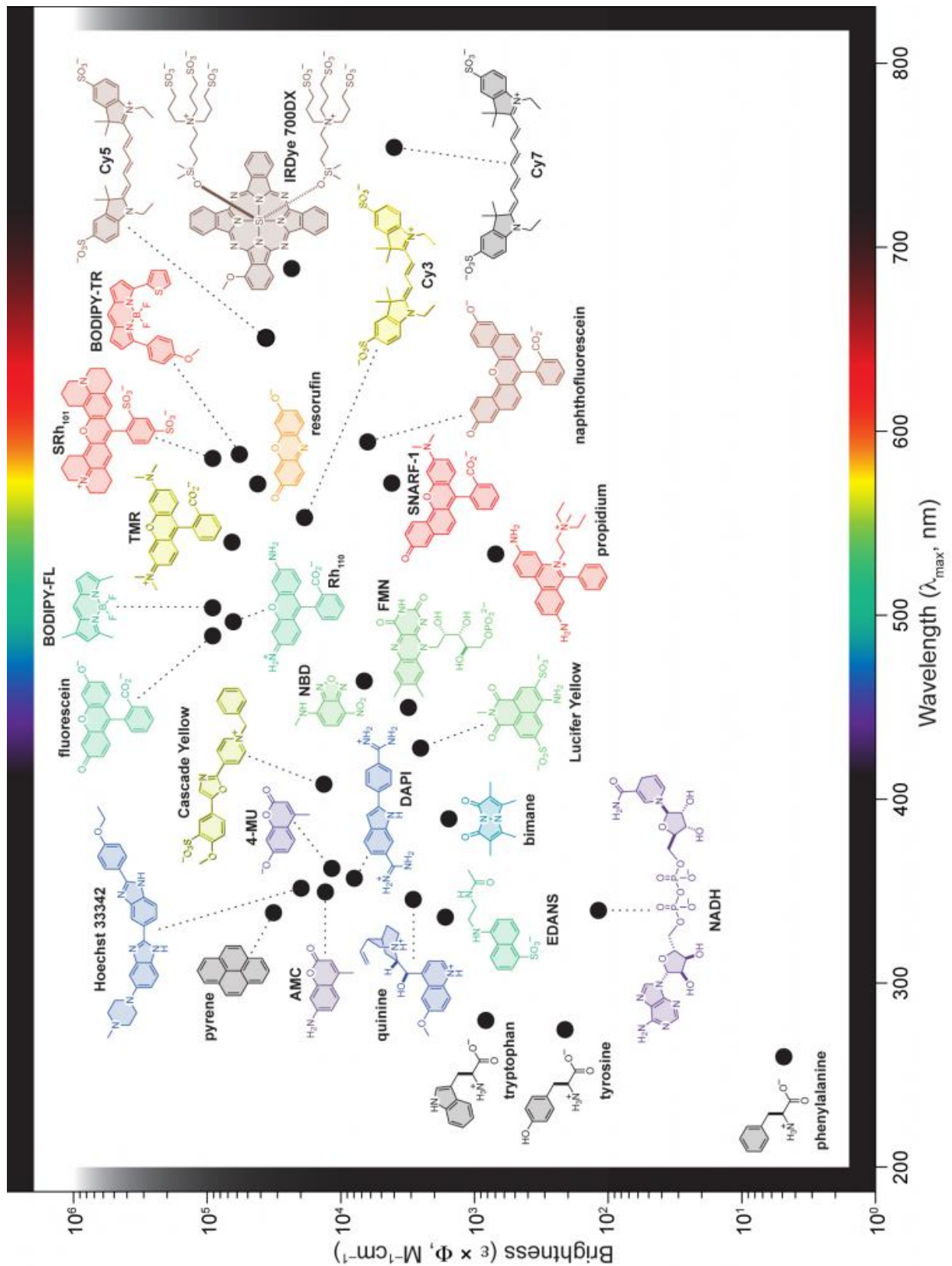


Figure 38. Brilliance des fluorophores. Tableau illustrant la diversité des fluorophores, classés selon leur brillance et leur longueur d'onde d'excitation (Lavis & Raines, 2008). Parmi les fluorophores utilisés pour la suite, on peut noter la brillance élevée du Bodipy et du TMR, dérivé de rhodamine, et celle moins élevée du biplane, similaire au tryptophane.

Une approche classique avec le FRET

Une technique de fluorescence largement utilisée pour l'étude des protéines est le FRET (*fluorescence resonance energy transfer*). Il s'appuie sur le fait qu'un électron excité puisse entrer en résonance avec un autre électron et lui transférer l'énergie correspondant à l'émission de photon, sans émettre de fluorescence (Figure 39). L'électron qui reçoit l'énergie pourra lui se désexciter en émettant de la fluorescence. Une condition nécessaire à ce phénomène est la superposition du spectre d'émission de la première molécule appelée donneur avec celui d'excitation de la deuxième molécule, l'accepteur.

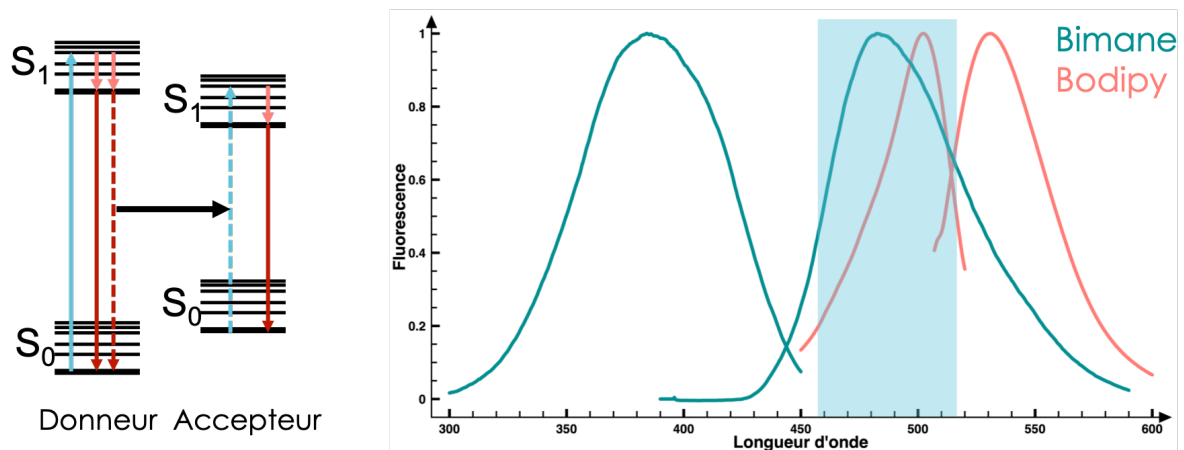


Figure 39. Principe du FRET. Illustration du phénomène de FRET sur un diagramme de Jablonski avec en en pointillé, un électron du donneur qui transfère son énergie par résonance à un électron de l'accepteur qui est alors excité. Ce transfert est possible si les spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur sont superposés ce qui est le cas du Bimane et du Bodipy représentés à droite.

Le FRET est possible si les deux molécules sont à une distance suffisamment proche pour permettre le transfert d'énergie. La sphère de FRET diminue très rapidement avec la distance mais la distance entre les deux molécules peut aller jusqu'à plusieurs dizaines d'Angströms. La distance mise à part, les autres paramètres influençant le FRET sont a priori connus et dépendent peu des conditions extérieures (Figure 40). Un obstacle important pour être quantitatif en termes de distance est l'évaluation de l'orientation des molécules, celle-ci peut être estimée mais la mesure de FRET reste souvent semi-quantitative.

Les différentes applications peuvent être l'étude des interactions entre deux protéines pour étudier par exemple leur niveau d'interaction ou de co-localisation ou bien l'étude des changements de conformations d'une protéine à condition que les réorganisations soient suffisamment grandes. En effet, la plupart des études en FRET utilisent des protéines

fluorescentes encodées génétiquement qui ont une taille conséquente. Néanmoins cette approche a pu être utilisée sur les récepteurs muscariniques (Messerer et al., 2017) ou sur les récepteurs métabotropes du glutamate (mGluR) et du GABA (GABA_B) où une large réorganisation des domaines peut être mesurée (Lecat-Guillet et al., 2017; Olofsson et al., 2014). Il est possible d'utiliser des sondes plus petites mais il faut alors trouver le moyen de marquer différemment la protéine avec deux fluorophores. Les fluorophores peuvent être un tryptophane de la protéine, une molécule liée via réaction sur une cystéine, ou incorporée sous forme d'acide aminé non naturel. Une étude récente propose d'utiliser comme partenaire de FRET un ion Cuivre qui seraient chélaté par deux histidines (Gordon, Munari, & Zagotta, 2018).

Ces marquages requièrent une mise au point importante et dans le cas des RCPs on s'attend à des changements de conformations plutôt de faible amplitude qui seront difficilement mis en évidence par du FRET. Jusqu'à maintenant aucune étude sur les RCPs n'a utilisé cette technique, seulement des approches de FRET avec un ligand fluorescent ont été menées sur le récepteur nicotinique, pour observer la liaison de l'épipibatidine (Schmauder, Kosanic, Hovius, & Vogel, 2011).

$$E_T = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6} \quad R_0 = 9,78 \times 10^3 (\kappa^2 \times n^{-4} \times Q_D \times J(\lambda))^{1/6}$$

Figure 40. Équation de FRET. L'efficacité de FRET (E) est fortement dépendante de la distance entre le donneur et l'accepteur (r). En connaissant la valeur de la distance de Forster R_0 , il est alors possible d'estimer cette distance en fonction de l'efficacité de transfert mesurée. R_0 est lui dépendant de l'orientation des deux molécules κ^2 ; du rendement quantique du donneur Q_D ; de l'indice de réfraction du milieu n et de l'intégrale de recouvrement des spectres d'excitation/émission $J(\lambda)$.

Le quenching induit par le tryptophane

Une approche alternative au FRET est le quenching par transfert d'électron. Lorsqu'un électron du fluorophore est excité et que son orbitale moléculaire est en contact avec celle d'une autre molécule, le quencher, il peut y avoir un transfert d'électron et il n'y a alors plus de fluorescence émise. L'électron excité du fluorophore passe dans l'orbitale moléculaire la plus basse non excitée (LUMO) du quencher pendant qu'un électron non excité du quencher passe dans l'orbitale moléculaire la plus haute occupée (HOMO) du fluorophore (Figure 41). L'électron excité ne peut plus émettre de fluorescence en retournant dans l'état non excité et

l'énergie est alors dissipée par de l'énergie thermique. Plusieurs mécanismes de transfert photo-induit ou d'échange d'électron existent et ne sont pas exclusifs. Ils ont tous la même dépendance à la distance fluorophore-quencher et le quenching observé est la combinaison de ces différents mécanismes.

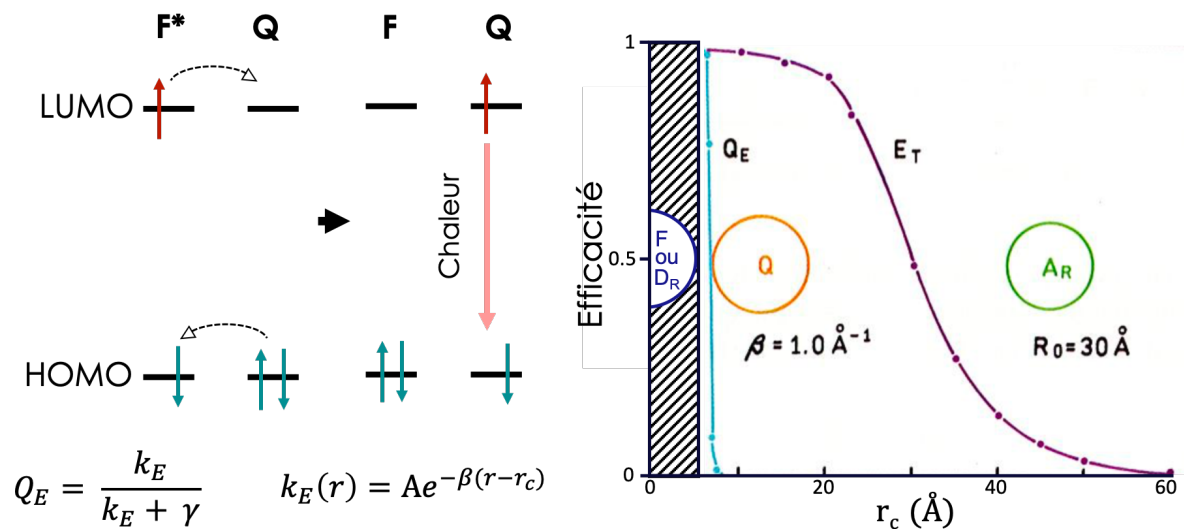


Figure 41. Mécanisme de quenching de la fluorescence et dépendance à la distance fluorophore-quencher. Schéma du phénomène de quenching entre le fluorophore (F) et le quencher (Q), les flèches en pointillées représentent les transferts d'électrons. L'efficacité de quenching Q_E est définie par le temps de vie du fluorophore en absence de quencher γ et la cinétique de quenching k_E qui dépend de la distance fluorophore-quencher de manière exponentielle. La distance de plus proche contact entre les fluorophores est notée r_c et la distance centre-centre entre les deux molécules est notée r . La constante β est proche de 1 \AA^{-1} et A autour de 10^{13} s^{-1} (Lakowicz, 2006). Le graphique à droite donne l'efficacité du quenching (Q_E) et du FRET (E_T) en fonction de la distance entre le fluorophore (F)/Donneur (D_R) et le quencher(Q)/accepteur (A_R).

Comme les orbitales électroniques doivent être en contact, ce phénomène a lieu sur des distances courtes de l'ordre de la dizaine d'Angströms, ce qui est bien inférieur au FRET, et le phénomène de quenching est encore plus dépendant de la distance puisque l'efficacité de quenching diminue de manière exponentielle avec le rayon. De nombreuses molécules peuvent quencher la fluorescence, dont les halogènes, l'oxygène, ou les molécules contenant des groupements indoles. Les tryptophanes des protéines sont capables de quencher de nombreux fluorophores et dans une moindre mesure, les tyrosines, phénylalanines, histidines ou cystéines. Cette capacité des acides aminés à quencher les fluorophores fait de ce

phénomène une technique de choix pour l'étude des protéines par fluorescence (Marmé, Knemeyer, Sauer, & Wolfrum, 2003).

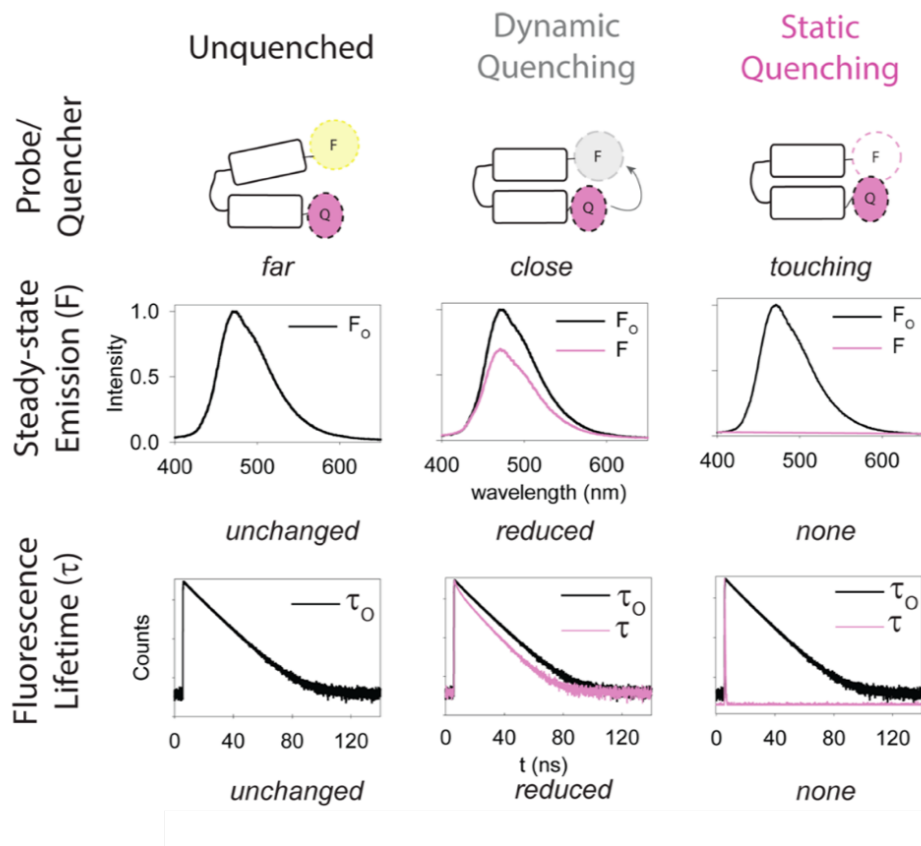


Figure 42. Quenching statique & dynamique. Lorsque le quencher est trop loin du fluorophore aucun changement d'intensité de fluorescence n'est observé. Au milieu, si le quencher est suffisamment proche on observe un quenching dynamique qui diminue l'intensité de fluorescence et le temps de vie de fluorescence. Lorsque les deux sont en contact, l'intensité de fluorescence diminue et les fluorophores quenchés statiquement ne contribuent pas aux mesures de temps de vie (Brunette & Farrens, 2014).

On peut distinguer deux processus photo-physiques dans les phénomènes de quenching. Le premier est appelé quenching collisionnel ou quenching dynamique et a la propriété de diminuer l'intensité de fluorescence ainsi que le temps de vie de l'état excité. Lorsque les deux molécules fluorophore et quencher sont très proches, un deuxième mécanisme est possible appelé quenching statique. Les deux molécules forment alors un complexe non excitable (ou bien le transfert est trop rapide et non mesurable). Dans ce cas l'intensité de fluorescence diminue mais le temps de vie reste le même (Figure 42).

Il est attendu que le quenching varie avec la température. Avec une augmentation de la température, l'agitation thermique va augmenter le quenching collisionnel et va induire une diminution de la fluorescence (figure 43). À l'inverse, lorsque le quenching est statique, on

peut s'attendre à une déstabilisation du complexe non-excité et donc à une diminution du quenching (Lakowicz, 2006).

L'approche de quenching pour étudier la conformation des protéines a été développée avec le bimane, un petit fluorophore particulièrement sensible au quenching par les tryptophanes et tyrosines. En marquant le lysozyme T4 avec le bimane sur des cystéines introduites à différentes positions plus ou moins proche des tryptophanes endogènes, les auteurs ont pu faire correspondre les intensités de fluorescence avec les distances cystéine-tryptophane, validant ainsi l'approche de quenching induit par le tryptophane (TriQ) pour cartographier les distances au sein d'une protéine (Brunette & Farrens, 2014; Doose, Neuweiler, & Sauer, 2009; Mansoor, DeWitt, & Farrens, 2010; Mansoor et al., 2002). Le TriQ a été utilisé pour étudier différentes protéines purifiées en solution dont la rhodopsine, le récepteur β -adrénergique ou la lactose perméase (Farrens, 2014; Smirnova, Kasho, & Kaback, 2014; Yao et al., 2006). Plus récemment, c'est cette approche qui a été choisie pour étudier les changements conformationnels de GLIC dans notre laboratoire avec l'utilisation du bimane (Menny et al., 2017). En effet, la méthode du TriQ est une approche idéale, compte tenu de la faible amplitude des réorganisations de ce récepteur et de la présence d'une seule cystéine endogène qu'il est possible de muter.

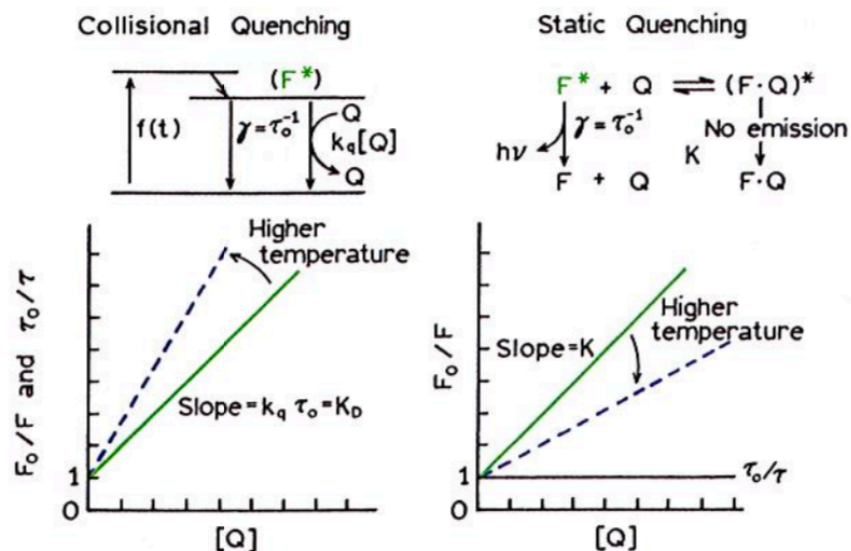


Figure 43. Dépendance à la température du quenching. Lorsque le quenching est collisionnel on s'attend à observer une augmentation de quenching avec la température qui augmente l'agitation et donc la probabilité de collision. En revanche, augmenter la température facilite la dissociation du complexe fluorophore-quencher ce qui diminue le quenching statique (Lakowicz, 2006).

À l'image du FRET, il est possible d'évaluer la distance entre le quencher et la sonde fluorescente pour avoir des informations quantitatives sur les réorganisations. Un problème commun au calcul de distance par FRET et en quenching est l'orientation et la flexibilité de la sonde qui peut grandement faire varier la sphère de quenching/FRET (Klose et al., 2012). Le phénomène de résonance dans le FRET est très dépendant de l'orientation du fluorophore alors que le quenching dépend seulement de la distance entre le centre des deux molécules et de la distance la plus faible entre les deux. Une étude systématique récente permet de développer cet aspect de quantification pour le quenching (Pantazis, Westerberg, Althoff, Abramson, & Olcese, 2018).

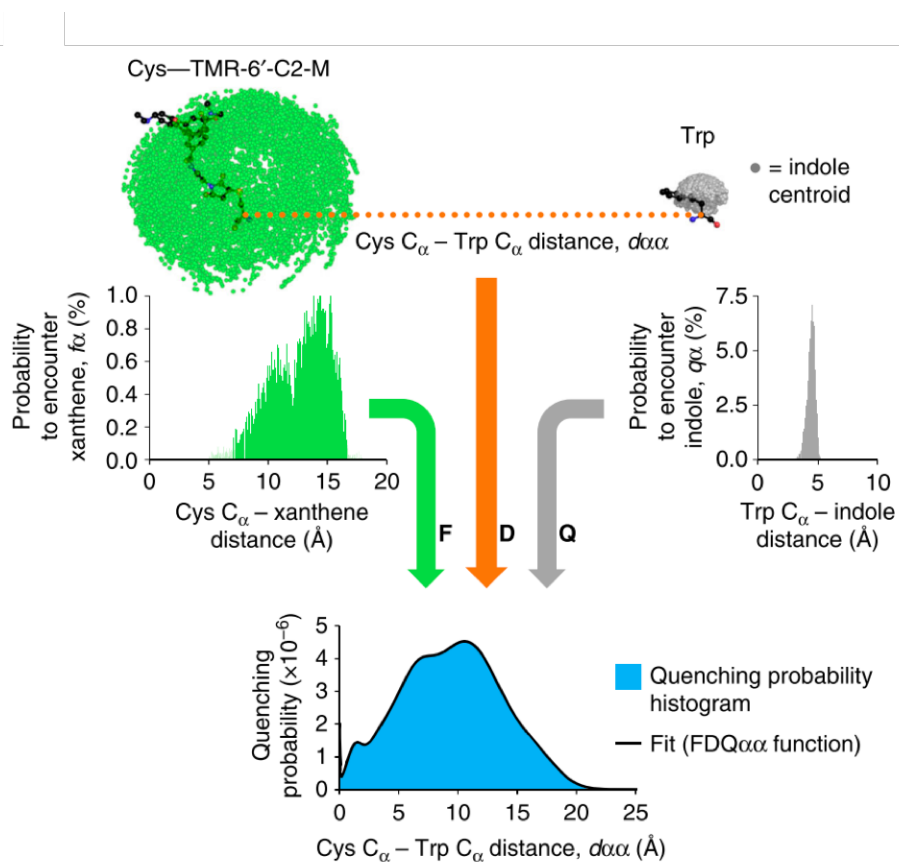


Figure 44. Évaluation de la distance fluorophore-quencher. En calculant la distance moyenne entre le centre du fluorophore et le C α et la distance moyenne de l'indole avec le C α du quencher on peut connaître la probabilité de quenching étant donné la distance entre les deux C α (Pantazis et al., 2018).

Dans cette étude, plusieurs fluorophores similaires dérivés de la rhodamine, mais avec des liens (*linkers*) plus ou moins grands ont été testés sur les canaux potassiques BK. Selon la taille de la sonde, l'intensité de fluorescence n'était pas la même et était corrélée à la distance

entre le tryptophane et la partie centrale, le xanthène du fluorophore. En modélisant la probabilité de contact entre le centre des deux molécules en fonction de la distance, les auteurs ont défini une fonction qui donne la probabilité de quenching. En combinant cette équation avec les mesures expérimentales il est possible d'obtenir une distance entre les carbones alpha ($C\alpha$) des deux senseurs (Figure 44).

La VCF, méthode de choix pour l'étude dynamique des canaux ioniques

La nécessité d'une technique complémentaire au TriQ en système purifié

L'étude de GLIC par quenching de la fluorescence du bimané est très informative pour l'étude structurale des intermédiaires de l'activation. Cette approche présente néanmoins quelques limitations notamment lorsque l'on veut l'appliquer à des RCPs eucaryotes.

Premièrement, cette technique requiert la purification de quantités importantes de récepteur et elle est donc difficilement applicable aux RCPs humains pour le moment, compte-tenu de la difficulté de produire et purifier ces récepteurs de manière stable et à large échelle.

Un autre inconvénient de l'approche TriQ sur protéine purifiée est que structure et fonction ne sont pas étudiées sur le même système biologique. Les changements de conformations des protéines en solution sont comparés à la fonction par électrophysiologie en ovocytes. Pour contourner cette limitation, deux choix sont possibles : enregistrer la fonction sur la protéine purifiée, ou enregistrer les changements de conformation par la fluorescence sur les récepteurs exprimés en cellule. Concernant le premier choix, certaines mesures ont été faites en regardant des flux de thallium à travers le canal de GLIC reconstitué en liposomes pour caractériser la fonction dans le même système que la fluorescence, mais cette approche est lourde à mettre en place (Menny et al., 2017). En revanche la deuxième possibilité est beaucoup plus simple à réaliser en couplant la détection de la fluorescence à un système d'électrophysiologie. Cette technique est la voltage-clamp fluorométrie (VCF) sur des ovocytes de xénopes, ou la Patch-clamp fluorométrie (PCF) selon la technique utilisée pour l'électrophysiologie.

Cette approche a aussi l'avantage de permettre une résolution temporelle alors que l'approche en système purifié se fait à l'équilibre. Il est donc possible avec la VCF de différencier les changements de conformation liés à l'activation et à la désensibilisation.

Le développement de la VCF

Dans les années 90, en l'absence de données structurales, des approches par mutagenèse ont été mises au point pour étudier les RCPs. La méthode d'accessibilité par substitution par des cystéines (SCAM) a été développée pour comprendre à quel niveau du canal se situait le point de constriction chez les récepteurs nicotiniques et quels étaient les résidus impliqués dans la formation du canal (Akabas et al., 1992). Cette approche a été étendue aux autres RCPs ainsi qu'à différents canaux ioniques (N.-L. R. Han, Clements, & Lynch, 2004; Karlin & Akabas, 1998). L'objectif était alors d'observer si l'application de molécules contenant un méthanesulfonate (MTS), un groupement réactif sur le groupement thiol de cystéines, allait perturber la fonction des canaux ce qui signifierait que la cystéine était accessible et donc exposée dans le canal. Si aucune perturbation n'était observée, alors la cystéine devait être orientée à l'intérieur de la protéine ou faisant face à la membrane. Les dérivés de MTS couramment utilisés étaient alors les MTSET, MTSEA, ou MTSES (Figure 45), mais il existe d'autres molécules réactives sur les thiols notamment les composés maléimides qui existent avec des dérivés fluorescents. L'évolution logique du SCAM a donc été de combiner le marquage sur cystéine avec la détection par fluorescence.

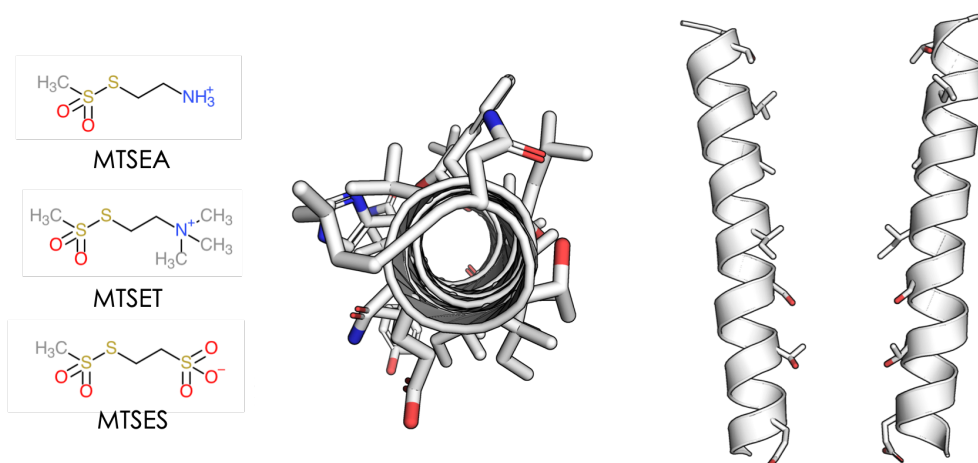


Figure 45. Principe du SCAM. À gauche les molécules réagissant sur les cystéines principalement utilisées pour le SCAM. Cette approche permet de connaître quels résidus sont accessibles le long d'une hélice et donc connaître les résidus constituant le canal. Cela permet aussi de savoir à quel niveau il y a des points de constriction dans certains états fermé/désensibilisé qui rendent certains résidus dans la partie basse du canal inaccessibles.

La première application des dérivés fluorescents réagissant sur les cystéines a été implémentée sur les canaux potassiques voltages dépendants Shaker, pour lesquels des cystéines ont été introduites sur le segment S4 pressenti pour être le senseur du voltage. Le degré de marquage par le Tétraméthylrodhamine (TMRM) selon la position de la cystéine a pu être mesuré par microscopie confocale et a permis de comprendre quels résidus était enfouis dans la membrane ou exposés en fonction du potentiel membranaire (Mannuzzu, Moronne, & Isacoff, 1996). Dans la même étude, un photomultiplicateur a été utilisé pour enregistrer parallèlement les changements de courant et de fluorescence en fonction du voltage membranaire (Figure 46).

Plusieurs études ont rapidement suivi sur ces mêmes canaux Shaker, cette fois les cystéines ont été introduites à différentes positions du canal pour comprendre les changements de conformation clés de ces protéines mais également caractériser des intermédiaires d'activation. (Baker, Larsson, Mannuzzu, & Isacoff, 1998; A Cha & Bezanilla, 1997). Pour certains canaux comme les canaux activés par les nucléotides cycliques (CNG), l'activation se fait au niveau intracellulaire et le patch-clamp est donc plus pertinent car il permet de contrôler la composition intracellulaire. Quelques années après les premières utilisations de la VCF, W. Zagotta et son équipe ont donc étendu l'approche à la Patch-Clamp Fluorométrie pour étudier les canaux CNG (Zheng & Zagotta, 2000). La PCF est plus lourde à mettre en place techniquement, mais continue à être utilisée en particulier lorsqu'il est nécessaire de contrôler le milieu intracellulaire, pour améliorer le rapport signal sur bruit en éliminant l'auto-fluorescence du compartiment intracellulaire et enfin pour améliorer les cinétiques (Kusch & Zifarelli, 2014). De récents développements permettent d'enregistrer la fluorescence avec une résolution temporelle de l'ordre de 100 microsecondes en utilisant un système de perfusion ultra-rapide, en parallèle d'une caméra et d'un système optique adapté (Wulf & Pless, 2018).

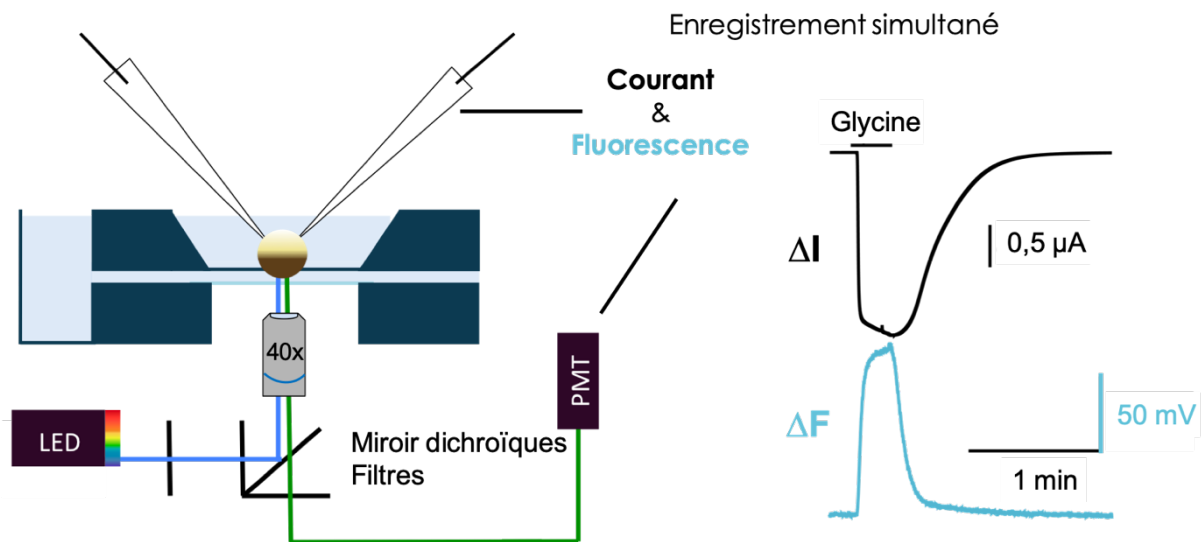


Figure 46. Voltage-clamp Fluorométrie. Schéma d'un système d'enregistrement de courant en voltage-clamp deux électrodes sur des ovocytes, couplé à un système d'optique qui peut exciter les fluorophores des récepteurs marqués à la membrane via une LED et enregistrer la fluorescence via un photomultiplicateur (PMT). À droite un exemple d'enregistrement obtenu sur le GlyR $\alpha 1$ marqué avec le fluorophore TAMRA en position Q67C.

Utilisation de la VCF pour l'étude des canaux ioniques

Apports dans la compréhension du fonctionnement des différents canaux ioniques

La VCF a d'abord été appliquée aux canaux voltage dépendants, mais a rapidement été étendue aux autres familles de canaux ioniques permettant de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans la transmission de signaux neuronaux et cardiaques (Talwar & Lynch, 2015; W. Zhu, Varga, & Silva, 2016). Globalement ces études ont permis une meilleure compréhension d'un certain nombre de changements de conformation des différents récepteurs, des couplages entre leurs domaines (sensible au voltage, site de liaison et canal) et l'effet de modulateurs pharmacologiques.

Pour les canaux voltage dépendant, la VCF a permis la compréhension des mouvements du domaine sensible au voltage, le segment S4, et la boucle S4-S5 qui permet le couplage avec le canal sur les canaux cardiaques hERG (Van Slyke et al., 2010) ou les canaux potassique Shaker Kv (Kalstrup & Blunck, 2018). Les changements de conformations ont aussi été étudiés sur les autres segments transmembranaires comme pour les canaux potassiques à large conductance BK (Pantazis & Olcese, 2012) ou sur les canaux à protons activé par le voltage Hv1 (Mony, Berger, & Isacoff, 2015). Le domaine sensible au voltage a aussi été étudié

isolé (Zhao & Blunck, 2016) et l'inhibition par le zinc des canaux Hv1 a été étudiée par VCF (Qiu et al., 2016).

La VCF a aussi apporté des informations sur le fonctionnement des P2XR, les récepteurs trimériques activés par l'ATP, et les canaux ASIC activés par les protons. Pour les P2XR, des études ont décrit par exemple le rôle du domaine riche en cystéine sur l'activation et la désensibilisation (Lorinczi et al., 2012) mais aussi l'aspect cinétique notamment du retour depuis l'état désensibilisé (Fryatt, Dayl, Cullis, Schmid, & Evans, 2016). Les ASIC ont également une composante de désensibilisation importante et la VCF a été utilisée pour décrire la séquence des changements de conformation des différents domaines pendant l'activation et la désensibilisation (Bonifacio, Lelli, & Kellenberger, 2014; Vullo et al., 2017).

L'approche de VCF a également permis la compréhension de la relation entre liaison et activation des canaux CNG (Biskup et al., 2007) et du mécanisme d'activation par la température des canaux TRP (Yang, Cui, Wang, & Zheng, 2010).

Enfin, la VCF peut être utilisée pour des protéines membranaires sensibles au voltage qui ne présentent pas de canaux. Ainsi le couplage entre domaines de la phosphatase voltage dépendante a pu être étudié (Kohout et al., 2010; Kohout, Ulbrich, Bell, & Isacoff, 2008) et le domaine sensible au voltage des récepteurs muscariniques M2 a pu être caractérisé (Barchad-Avitzur et al., 2016). Certains transporteurs ont été étudiés par VCF comme le co-transporteur sodium/phosphate NaPi-IIb pour lequel des changements de conformation ont pu être observés, précisant l'ordre de liaison des ions sodium et du phosphate et permettant la proposition du modèle de cycle de transport pour cette protéine (Virkki, Murer, & Forster, 2006).

Utilisation de la VCF pour l'étude des RCPs

La VCF a également été beaucoup utilisée pour l'étude des RCPs sur les GABA_AR, les nAChR et surtout les GlyR pour étudier les changements de conformation mais aussi pour comprendre comment la liaison de l'agoniste conduit à l'ouverture du canal.

Pour les récepteurs nicotiques, les mouvements ont été étudiés au niveau de l'hélice M2 du récepteur de type musculaire (D. S. Dahan et al., 2004) et du site orthostérique des $\alpha 4\beta 2$ (Mourot, Bamberg, & Rettinger, 2008). Dans les deux cas, des changements de fluorescence ont été observés à de faibles concentrations d'acétylcholine, parfois

insuffisantes pour observer un courant suggérant des changements de conformation en amont de l'activation au niveau du site orthostérique et des hélices M2.

Chez les récepteurs GABA_A hétéromériques, ce sont également le site orthostérique et le haut de M2 qui ont principalement été étudiés par VCF. Les différences de réponse aux agonistes et antagonistes ont été observés chez les récepteurs homomériques $\rho 1$ (Chang & Weiss, 2002) et chez les hétéromériques $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ (Muroi, Theusch, Czajkowski, & Jackson, 2009; Q. Wang, Pless, & Lynch, 2010) pour lesquels la potentialisation par le pentobarbital a aussi été étudiée (Khatri, Sedelnikova, & Weiss, 2009). Ces différentes études mettent surtout en évidence le mouvement des interfaces non liantes qui peut être similaires aux mouvements des interfaces liant l'agoniste ou de moindre amplitude selon la nature de la sous-unité. Ces observations suggèrent une perte transitoire de symétrie lors de l'activation des récepteurs hétéromériques.

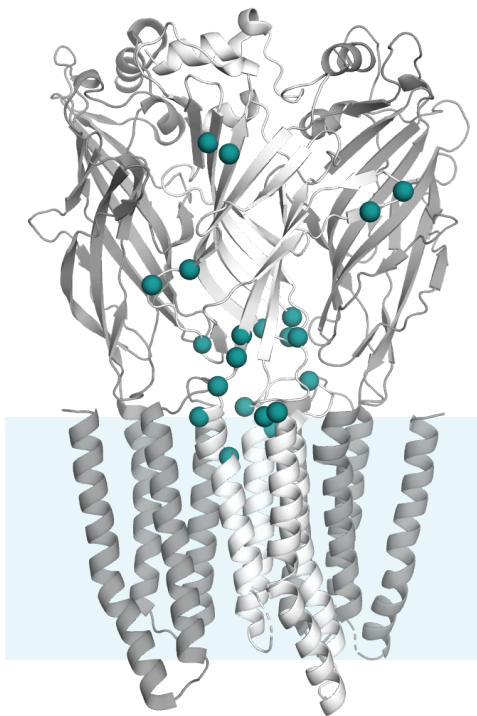


Figure 47. Positions des senseurs des transitions de GlyR. Résumé des différentes positions de cystéine-fluorophores testés dans la littérature sur le GlyR $\alpha 1$ et $\alpha 3$ pour lesquels un ΔF peut être observé en VCF. Ces positions sont au niveau du site orthostérique et des boucles à l'interface, ainsi que sur le haut des hélices transmembranaires M1, M2 et M4.

Le RCP qui a été le plus étudié par VCF est de loin le récepteur à la Glycine (Figure 47). Une vingtaine de positions sur les récepteurs $\alpha 1$, $\alpha 3$ et $\alpha 1\beta$ ont permis d'observer des changements de conformation. Des changements de conformations variables ont été observés au niveau de l'hélice M2 et du site de liaison selon l'efficacité partielle ou totale de l'agoniste (Pless, Dibas, Lester, & Lynch, 2007; Pless & Lynch, 2009c). Comme pour les autres

RCPs, les changements de conformations des sous-unités liantes et non liantes ont été observées (Pless & Lynch, 2009a; Shan, Han, & Lynch, 2012a). Les effets différents de la glycine, la strychnine et l'ivermectine ont également été mesurés (Pless & Lynch, 2009b; Q. Wang & Lynch, 2012). Il a aussi été montré que les changements de conformation étaient différents à l'activation et à la désensibilisation (Q. Wang & Lynch, 2011). D'autres effets ont également été appréhendés par la VCF comme celui de la phosphorylation (L. Han, Talwar, Wang, et al., 2013), l'orientation de M3 et M4 sur $\alpha 1$ et $\alpha 3$ (L. Han, Talwar, & Lynch, 2013) et l'effet de certaines mutations hyperekplexiques (Shan, Han, & Lynch, 2011, 2012b). Globalement, la VCF s'est avérée être une approche très utile pour l'étude des RCPs. Même si les ΔF sont, dans la grande majorité des études, difficiles à interpréter en termes de changement de conformation précis.

Application du TriQ en VCF

Dans la plupart des études de VCF, ce sont en général les mêmes fluorophores dérivés de la rhodamine qui ont été utilisés : MTS-TAMRA ; MTSR, TMRM ou l'Alexa Fluor 488. Les changements de fluorescence (ΔF) observés sont alors dus à un changement d'environnement qui est souvent inconnu. En effet, le changement d'intensité de fluorescence peut rapporter un changement d'hydrophobicité/polarité autour de la sonde, une interaction avec un résidu adjacent/quencher ou même une interaction directe avec un ligand. Pour permettre une interprétation structurale des ΔF observés, le quenching par le tryptophane a été utilisé dans quelques études. Cette approche a d'abord été utilisée en PCF pour l'étude des canaux CNG (Islas & Zagotta, 2006). En VCF, le quenching par les tryptophanes a été utilisé sur les canaux voltage dépendants BK (Pantazis & Olcese, 2012) et a permis de caractériser de manière précise des paires de fluorophore-quencher et ainsi expliquer les différences de mouvement des différents segments membranaires S0 à S4. L'introduction d'un tryptophane sur le canal proton voltage dépendant Hv1 a confirmé l'importance des mouvements du segment S1 dans l'activation (Mony et al., 2015). Cependant le ΔF observé est souvent la somme de plusieurs facteurs, à la fois la présence de quencher et le changement d'environnement local, compliquant les interprétations. Néanmoins, une étude sur les canaux ASIC a montré que l'introduction de tryptophanes à proximité des différentes positions du fluorophore, permettait d'observer des ΔF robustes et rendait possible l'interprétation d'un certain nombre de ΔF observés (Vullo et al., 2017).

Développements techniques

Selon les questions biologiques posées, différentes améliorations de la VCF ont été développées. Par exemple, pour les canaux qui ont une faible expression en ovocyte comme les canaux sodiques NachBac, la PCF en cellule entière a été développée (Blunck, Starace, Correa, & Bezanilla, 2004).

Le marquage sur cystéine requiert l'accessibilité de la chaîne latérale et limite l'étude des changements de conformation des domaines intracellulaires et transmembranaires. Pour contourner cette contrainte, l'utilisation d'acides aminés non naturels fluorescents (fUAAs) s'est développé ces dernières années (Kalstrup & Blunck, 2017). L'incorporation d'Anap dans le domaine intracellulaire des phosphatases voltage-dépendantes a permis une meilleure compréhension de leur activité catalytique (Sakata, Jinno, Kawanabe, & Okamura, 2016). Cette approche a récemment été utilisée sur le récepteur glycine et permet de montrer que le mécanisme d'action des agonistes partiels serait déterminé au niveau de l'orientation entre les boucles $\beta 1$ - $\beta 2$, $\beta 8$ - $\beta 9$ et Cys-loop (Soh, Estrada-Mondragon, Durisic, Keramidas, & Lynch, 2017).

L'utilisation du FRET plutôt qu'un simple marquage a rapidement été développé sur les canaux potassiques Shaker pour mieux interpréter les ΔF observés (Albert Cha, Snyder, Selvin, & Bezanilla, 1999). Le FRET permet de passer en fluorescence en molécule unique et de combiner les mesures de ΔF avec des enregistrements en canal unique. De telles expériences ont pu être réalisées sur les canaux voltage dépendant BK (Ide, Takeuchi, Aoki, & Yanagida, 2002) et ceux activés par la gramicidine (Borisenko et al., 2003; Harms et al., 2003). De par la difficulté technique de ces expériences, les apports d'une approche en molécule-unique restent limités, mais des informations sur la coopérativité, la dynamique des transitions et la caractérisation d'intermédiaires devrait émerger dans le futur (Weatherill & Wallace, 2015).

Considérations sur la résolution temporelle

Un gap dans la résolution temporelle

Lors de l'étude sur GLIC par TriQ (Menny et al., 2017), les mesures ont d'abord été réalisées à l'équilibre aux différents pH. Pour valider la présence de l'état pré-actif et le caractériser de manière dynamique, des mesures en mélange rapide (*stopped flow*) ont été

menées (Figure 48). Elles montrent que la majorité du changement de fluorescence a lieu dans le temps mort de l'appareil qui est de 2 ms, ce qui est bien plus rapide que la cinétique d'activation de GLIC mesurée en patch-clamp avec un système de perfusion ultra-rapide qui montre une constante de temps d'activation τ autour de 155 ms (Laha, Ghosh, & Czajkowski, 2013).

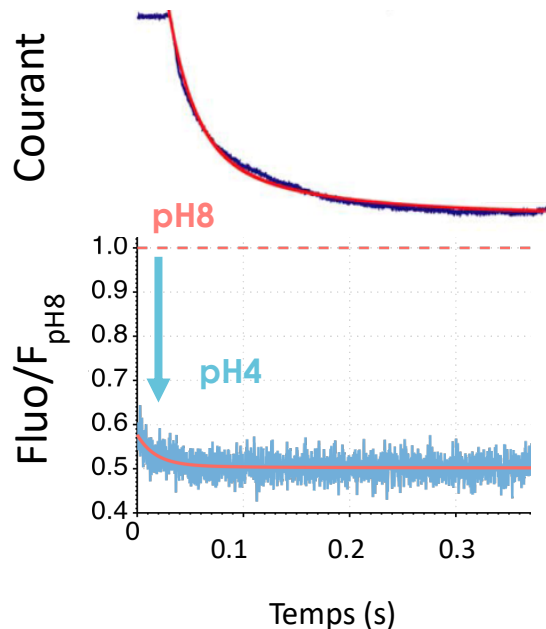


Figure 48. Comparaison des cinétiques de pré-activation et d'activation de GLIC.

En haut, cinétique d'apparition du courant de GLIC en patch outside-out (Laha et al., 2013). En bas, cinétique de variation de fluorescence en stopped-flow d'un senseur de la pré-activation de GLIC. L'échelle de temps est la même et on observe une constante de temps de l'ordre de la centaine de millisecondes pour l'activation alors que la pré-activation n'est pas résolue, elle est inférieure au temps mort de l'appareil, en dessous de quelques millisecondes.

Pour pouvoir caractériser la cinétique des ΔF et donc de l'apparition d'un état pré-actif, il faut à la fois avoir un système de changement de solution ultra-rapide, et une détection de fluorescence qui puisse se faire instantanément. En VCF sur les canaux ligand-dépendants, c'est la vitesse de perfusion qui est limitante à cause du diamètre de 1 mm de l'ovocyte qui implique une perfusion de l'ordre de la seconde même si certains systèmes automatisés peuvent descendre en dessous des 100 ms (Baburin, Beyl, & Hering, 2006). En patch-clamp, l'échange de solution peut se faire dans la gamme de la centaine de microsecondes (Laha et al., 2013), mais les systèmes de PCF les plus performant ont une résolution temporelle pour la fluorescence de l'ordre de la centaine de millisecondes (Wulf & Pless, 2018).

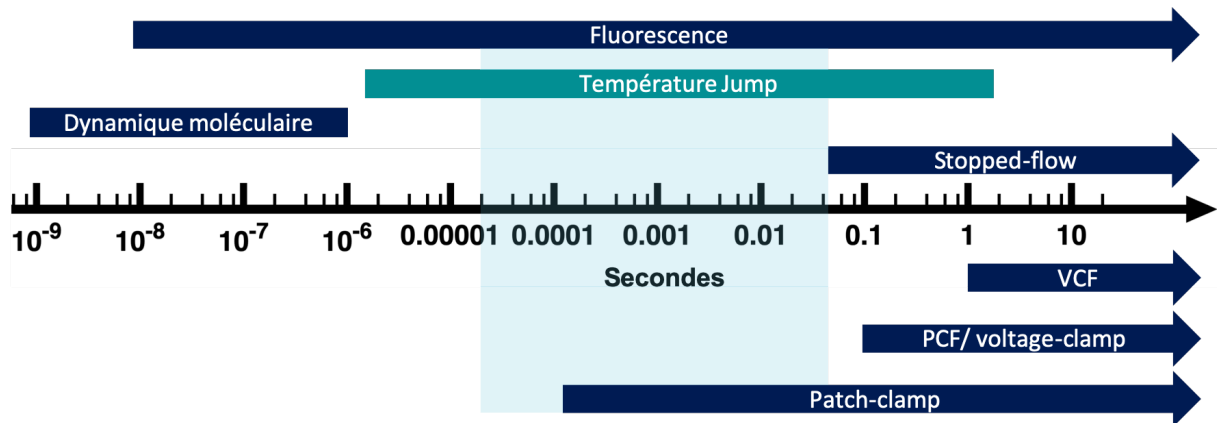


Figure 49. Échelle temporelle. Illustration de la résolution temporelle des différentes approches pour l'étude cinétique des RCPs. La zone bleutée est la gamme de temps qui nous intéresse pour l'élucidation de la cinétique de pré-activation de GLIC.

De l'autre côté de l'échelle temporelle, les simulations par dynamique moléculaire sont elles aussi limitées temporellement. Bien que l'augmentation des capacités de calculs permettent de faire des simulations non biaisées de plus en plus longues, les simulations de systèmes complexes comme les RCPs restent en général sous la barre de la microseconde. La cinétique de pré-activation de GLIC se trouve dans une gamme temporelle qui n'est pas accessible par les approches classiques cités ci-dessus (Figure 49), et on peut imaginer que cela est aussi le cas pour la pré-activation/activation des RCPs eucaryotes qui ont une activation bien plus rapide que GLIC. En effet il a été montré que l'activation du récepteur GABA était sub-milliseconde (Laha et al., 2013). Il est donc nécessaire de développer d'autres approches pour résoudre temporellement l'apparition de cet intermédiaire pré-actif de GLIC décrit par le TriQ et potentiellement étudier les transitions des RCPs eucaryotes dans le futur.

Le retour des études par relaxation

Pour s'affranchir des limitations liées à l'application de ligand ou au changement de pH pour GLIC, une possibilité est de perturber un autre facteur physique comme le champ électrique, la température ou encore la pression du système à l'équilibre et de regarder la relaxation du système vers un équilibre qui correspond aux nouvelles conditions physico-chimiques. Le temps pour atteindre ce nouvel équilibre est alors limité par la vitesse de réaction du système et elle est appelé relaxation chimique (Chock, 1971). Ces méthodes de relaxation ont été utilisées, notamment pour résoudre la cinétique de réactions enzymatiques rapides. Pour observer le retour à l'équilibre, il est possible de suivre les propriétés spectroscopiques ou de conductivité du système. Une technique développée par Manfred

Eigen dans les années 50 est l'approche par saut de température (T-jump) où la température d'un système à l'équilibre et augmentée en quelques microsecondes grâce à une décharge électrique permettant ainsi d'étudier la relaxation avec une très grande résolution temporelle (Thusius & Vandebunder, 1975). Dès les prémices de cette technique, l'idée a été émise qu'en plus de pouvoir résoudre les cinétiques enzymatiques, cette approche donnait la possibilité de révéler les étapes intermédiaires des processus allostériques. Chaque étape ayant sa propre cinétique, le spectre de temps de relaxation mesuré en T-jump pourrait éclaircir les mécanismes des protéines allostériques (Eigen, 1968).

Cette approche rend donc possible l'observation directe de la relaxation à l'équilibre et l'analyse cinétique permet d'extraire les constantes de temps caractéristiques qui reflètent la complexité du système biologique. De telles expériences ont été menées par exemple sur l'enzyme glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) pour laquelle la liaison du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) a été étudié par mesure d'absorption (Kirschner, Eigen, Bittman, & Voigt, 1966).

Un appareil de T-jump couplé à la fluorescence a été mis au point en 1974 (Rigler & Widengren, 2018) et a permis d'observer la cinétique de liaison de l'agent intercalant acridine orange avec une molécule d'ADN (Ramstein, Ehrenberg, & Rigler, 1980). Par la suite, le T-jump couplé à la fluorescence a été utilisé pour répondre à de nombreuses questions biologiques, entre autres pour caractériser les cinétiques de formation de structures secondaires des molécules d'ADN et des peptides, de repliement de protéines et de formation de cœurs hydrophobes mais aussi pour étudier les cinétiques enzymatiques et d'interactions protéine-ADN (Kubelka, 2009). Bien que cette méthode soit lourde à mettre en place, elle représente une solution pour faire le pont entre les gammes de résolution temporelle accessibles en dynamiques moléculaires et par des approches expérimentales classiques et a le potentiel de résoudre les cinétiques des transitions des RCPs.

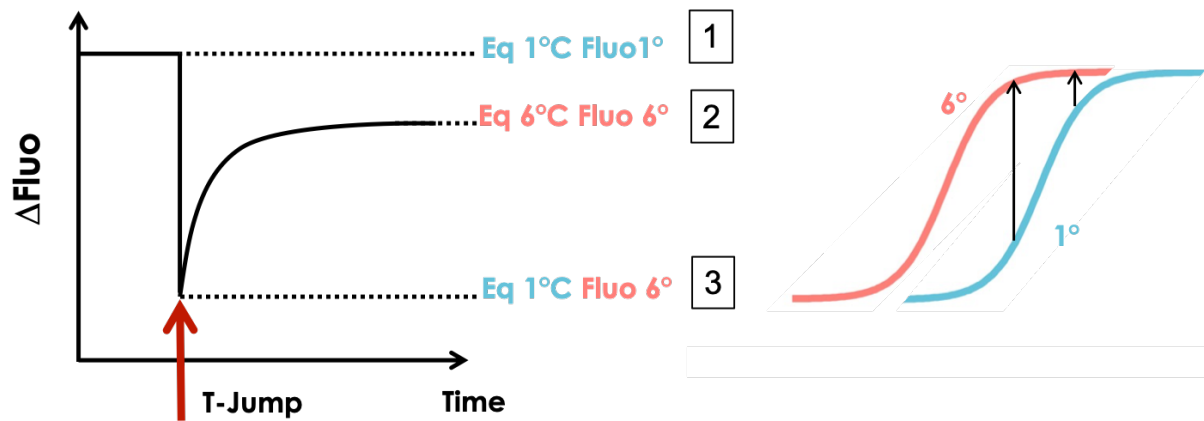


Figure 50. Principe du saut de température (T-jump). La mesure commence à l'équilibre pour une température et une concentration en ligand données (1). Après un saut rapide de température, le fluorophore va en quelques microsecondes émettre une intensité de fluorescence différente qui correspond à ses propriétés intrinsèques pour cette nouvelle température (2). Enfin la relaxation de la protéine va avoir lieu pour atteindre l'équilibre correspondant la nouvelle température (3). Le changement de fluorescence associé à cette relaxation aura une amplitude d'autant plus grande que l'équilibre de départ sera proche de l' EC_{50} , comme illustré avec les courbes à droite.

Problématiques restantes

Compte tenu des connaissances actuelles, les éléments clés pour permettre une meilleure compréhension du fonctionnement des RCPs, sont la caractérisation structurale des différents états intermédiaires et l'étude des transitions qui les relient. Une avancée dans l'acquisition de ces données permettra de faire émerger de nouvelles stratégies de développement de molécules pharmacologiques afin de moduler spécifiquement l'activité de certains RCPs ou de compenser leur fonctionnement pathologique.

Les études menées sur GLIC par quenching de la fluorescence induit par les tryptophanes ont permis une caractérisation structurale précise d'un état pré-actif (Menny et al., 2017). Il reste néanmoins certaines questions à approfondir qui seront présentées dans ce travail en trois temps :

Premièrement, les mesures en *stopped-flow* ont montrés que l'apparition de l'état pré-actif de GLIC était très rapide, en dessous de quelques millisecondes. Par ailleurs, il existe un manque d'approches expérimentales pour caractériser précisément la cinétique d'apparition de cet état. L'objectif sera donc d'appliquer une méthode d'étude par relaxation, le T-Jump pour caractériser la cinétique de pré-activation.

Ensuite, bien que de nombreuses mutations pathologiques ou perturbant la fonction des RCPs aient été caractérisées par électrophysiologie, peu d'informations existent sur leur impact au niveau structural. En particulier, le but de cette partie sera d'étudier l'effet de mutations sur les transitions de GLIC en prolongeant l'approche de quenching de fluorescence induit par les tryptophanes.

Enfin, l'essor des études structurales des RCPs eucaryotes souligne le besoin d'utiliser des approches complémentaires pour étudier les transitions entre états de ces protéines. Même si le fonctionnement global des RCPs semblent être conservé par rapport aux homologues bactériens, il est important d'avoir des outils pour étudier directement les transitions des récepteurs eucaryotes. L'intention de cette partie sera de développer une approche de voltage-clamp fluorométrie pour observer les transitions des récepteurs GlyR et 5-HT₃R.

RESULTATS
MATERIELS & METHODES

Résultats

Après une description des méthodes utilisées, les résultats sont organisés en trois parties : étude de la cinétique de pré-activation de GLIC par T-jump ; étude par quenching à l'équilibre de l'impact structural des mutations et modulateurs sur GLIC en solution et enfin étude par voltage-clamp fluorométrie des transitions des récepteurs eucaryotes GlyR et 5-HT₃R.

Dans la suite de ce manuscrit, la nomenclature utilisée pour décrire les mutations sera le numéro du résidu précédé de l'initiale de l'acide aminé d'origine et suivi de l'initiale de l'acide aminée par lequel il a été remplacé par mutagenèse. Les mutations en cystéine (ex : P250C) indiquent les positions sur laquelle le fluorophore a réagi pour les études de quenching de la fluorescence. Sauf indication contraire, tous les mutants de GLIC comportent la mutation C27S qui prévient le marquage non spécifique du bimané en éliminant la seule cystéine endogène, cette mutation n'a pas d'effet notable sur la fonction du récepteur.

Matériels & Méthodes

Solutions et composés

Composition des différentes solutions tampons utilisées :

- Tampon A (Purification GLIC) Tris 20 mM, NaCl 300 mM à pH 7,4
- Tampon B (Fluorescence à l'équilibre en détergent et asolectine) 300 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 5.3 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ à pH 8 (Tampon B).
- Tampon C (protéoliposomes PEPG) 3 mM Tris, 20mM citrate, 300 mM NaCl à pH 7,4
- Solution de Barth (stockage ovocytes) NaCl 88 mM ; KCl 1 mM ; NaNO₃ 0.66 mM ; CaCl₂ 0.75 mM MgSO₄ 0.82 mM et Hepes 10 mM à pH 7,6
- Solution OR2 (digestion ovocytes) NaCl 85 mM ; Hepes 5 mM et MgCl₂ 1 mM à pH 7,6
- Solution ND96 (électrophysiologie GlyR 5-HT₃R) NaCl 96 mM ; KCL 2 mM ; Hepes 5 mM ; MgCl₂ 1 mM ; CaCl₂ 1,8 mM pH 7,6.
- Tampon MES (électrophysiologies GLIC) NaCl 100 mM ; KCl 3 mM ; MES (acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique) 10 mM ; CaCl₂ 1 mM MgCl₂ 1 mM pH 7,4.

Les fluorophores commerciaux utilisés sont le monoBromobimane (Sigma) ; Bodipy 507/545 iodoacétamide (Molecular Probes) ; le Lucifer Yellow iodoacétamide (Setareh Biotech), le MTS-TAMRA (Toronto Research Chemicals et Interchim) ; le Hylite 488-C2-maleimide (Anaspec) et le MTSR (MTS Sulfo Rhodamine ; Toronto Research Chemicals).

Mutagenèse

Les gènes codant pour GLIC sont dans un vecteur pet20b pour la production en bactérie et en pmt3 pour GLIC et GlyR α 1 humain pour l'expression en cellules en cultures et en ovocytes. Ces deux vecteurs possèdent un gène de résistance à l'ampicilline et ont été décrits précédemment (Bocquet et al., 2007). En pet20b, le gène de GLIC est fusionné à la suite du gène codant pour la *Maltose Binding Protein* (MBP). Pour le pmt3, GLIC est précédé du peptide signal du récepteur nicotinique α 7 et GlyR α 1 a son propre peptide signal. GLIC possède un tag HA en C-terminal et les mutants de GlyR issus des deux premières phases de conceptions de paires de quenching ont le Strep-II tag en C-terminal comme décrits dans une étude précédente (X. Huang et al., 2015). Les mutants sont obtenus par une approche classique de mutagenèse dirigée.

GLIC en solution

Production et purification

La production, la purification et le marquage des mutants de GLIC ont été réalisés de manière similaires aux protocoles précédemment décrits avec quelques modifications (Bocquet et al., 2009; Menny et al., 2017). L'ADN plasmidique de GLIC est transformé dans des bactéries de *E.coli* (souche C43) et le récepteur est exprimé à 20°C après induction par 100 µM d'IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside). Les culots de bactéries sont lysés par sonication en tampon A et les membranes sont récupérées par ultracentrifugation (40 000 rpm). Les protéines membranaires sont solubilisées par un ajout de détergent n-dodécyl-β-D-maltoside (DDM) à 2% sur la nuit à 4°C et sont récupérées dans le surnageant après ultracentrifugation. GLIC-MBP est purifié sur une résine d'affinité amylose, la concentration en DDM est réduite à 0.02% par des lavages successifs puis l'élution est réalisée avec une concentration saturante de maltose. Une première chromatographie par exclusion de taille est réalisée sur une colonne de gel filtration Superose 6 increase 10/300 GL (GE Healthcare) pour séparer GLIC-MBP de la protéine contaminante Maltoporine exprimée de manière endogène par les bactéries et qui se lie également à l'amylose. GLIC-MBP est ensuite clivée par la thrombine et marquée par le fluorophore avec un ratio molaire (1:5) à 4°C sur la nuit. Une deuxième chromatographie permet de séparer GLIC de la MBP et du fluorophore n'ayant pas réagi, la protéine marquée est ensuite dosée et flash-congelée puis stockée avant utilisation à -80°C.

Reconstitution en liposomes

Les reconstitutions en asolectine et PE:PG (Phosphatidylethanolamine : Phosphatidylglycérol) sont faites de manière similaire. L'asolectine est stockée à -20°C en solution à 100 mM après solubilisation de poudre extrait de soja (Sigma Aldrich) à l'aide d'un Potter dans une solution de tampon A. Les lipides PE et PG sont stockés à 25 mg/mL en chloroforme à -20°C. Le chloroforme est évaporé par centrifugation sous-vide et le film de lipides est repris dans une solution tampon citrate contenant 23 mM de citrate pour obtenir en composition finale dans la solution de protéoliposomes la composition du tampon C. Un ratio massique protéines:lipides de 1:5 est utilisé et les reconstitution sont faites pour 200 µg de protéine et 1mg de lipides. Pour le PE:PG un ratio molaire 2,7:1 est utilisé comme décrit dans une étude précédente (Dellisanti et al., 2013). Les lipides sont solubilisés en micelles par

un excès de DDM (concentration finale 0.7%) et sont incubés avec la protéine à 2mg/mL en tampon Tris pendant 1h dans un volume final de 1 mL (Concentration en DDM à 0.2%). Des Biobeads (Bio-Rad) préalablement activés par des lavages en méthanol puis en eau sont utilisés pour adsorber le DDM. Un ajout successif de 50, 150 et 300 mg de Biobeads après 30min à 1h d'incubation permet l'adsorption progressive du DDM et la formation des protéoliposomes. La reconstitution est effectuée à température ambiante pour permettre l'action des Biobeads et l'échantillon est protégé de la lumière pour éviter le photoblanchissement du fluorophore sur la protéine. La reconstitution est ensuite récupérée par une légère centrifugation qui permet d'enlever les agrégats et stockée à 4°C jusqu'à utilisation.

Mesures à l'équilibre

Les mesures à l'équilibre de GLIC en détergent sont effectuées avec un fluorimètre Jasco 8200 équipé d'un Peletier pour contrôler la température. Des solutions acides de tampon phosphate (tampon B) sont préparées par ajout d'HCl 2 M pour obtenir un pH final précis après mélange avec le tampon A en détergent. Pour les échantillons en PEPG le mélange est effectué en tampon C. Une solution est préparée pour toutes les 0.5 unité de pH pour la gamme de pH 8 à pH 3. L'échantillon de protéine en détergent est dilué en tampon A à environ 50 µg/mL puis un mélange 1:1 en volume est effectué avec une solution de tampon B pour obtenir le pH désiré. La mesure en fluorescence est effectuée avec une excitation à 385 nm et le spectre d'émission est enregistré entre 420 et 530 nm. Pour chaque expérience, une mesure est réalisée à pH 7,4 en présence de SDS à 1 % pour normaliser la valeur de fluorescence et pouvoir comparer les mutants entre eux. Un spectre de fluorescence du tryptophane est enregistré avant et après l'ajout de SDS pour vérifier l'état natif initial et la dénaturation de la protéine. Les valeurs d'excitation et de spectre d'émission ont été adaptées pour les fluorophores Lucifer Yellow (Ex 426 ; Em 480-580) et pour le Bodipy (Ex 512 ; Em 520-600). Les paramètres d'enregistrement (largeur des fentes, vitesse d'enregistrement, sensibilité du photomultiplicateur...) sont inchangés entre les expériences pour un même fluorophore. Les mesures à 10 et 6°C en PEPG sont effectuées pour chaque pH après refroidissement de la cuve dans le spectrophotomètre.

Mesures en T-jump

Les échantillons de T-jump sont préparés de la même manière que ceux à l'équilibre. Le mélange 1:1 des solutions de protéoliposomes et de tampon citrate est refroidie à 1.6°C dans la cuve de T-jump. À la suite d'un arc électrique passant à travers la solution, la température est augmentée instantanément à 6 °C. La fluorescence est ensuite mesurée à l'aide d'un fluorimètre couplé à l'appareil de T-jump. L'analyse des traces consiste en une correction des données pour le refroidissement et le photo-blanchiment sur la fin de l'enregistrement. Une analyse multi-exponentielle a été réalisée pour extraire les constantes de temps des différentes composantes de relaxation.

Électrophysiologie voltage-clamp à deux électrodes

Injection

Les ovocytes de *Xenopus laevis* de stade de développement VI proviennent soit du Centre de Ressources Biologiques Xénopes de Rennes et sont livrés dans un fragment d'ovaire, soit de la société EcoCyte Bioscience (Allemagne) et sont prêts à être injectés. Les ovocytes provenant de Rennes sont défoliculés par incubation avec de la collagénase de type II à 1mg/mL pendant 2 à 3h dans une solution sans calcium OR2. Après tri, les ovocytes digérés sont conservés à 4°C en solution Barth. L'injection nucléaire est réalisée avec un mélange de 80 ng/μL d'ADN plasmidique de récepteur (GLIC, GlyR ou 5-HT₃R) et 25 ng/μL de GFP ou mCherry (selon le fluorophore utilisé en VCF) pour pouvoir cribler les ovocytes injectés avec succès. L'expression se fait à 18°C entre 2 et 5 jours après l'injection puis les ovocytes sont gardés à 16°C le jour de l'enregistrement. Une étude récente a montré que l'injection d'un inhibiteur de kinase le HG-9-91-01 à 100 μM permettait de stimuler la production de mélanine des ovocytes et ainsi obtenir un pôle animal plus foncé réduisant le bruit de fond (Lee & Bezanilla, 2019). Cette molécule a donc été ajoutée au moment de l'injection pour la partie la plus récente des expériences.

Voltage-clamp électrophysiologie et fluorométrie

Les ovocytes étants positif à la GFP ou la mCherry sont soit enregistrés directement, ou bien incubés avec le fluorophore puis enregistrés dans les 3h suivants le marquage. Pour la caractérisation fonctionnelle des mutants de GLIC, les ovocytes sont marqués pendant 1 h au Bimane sel de Bunte à 1 mM. Pour la VCF, les concentrations et temps de marquage ont

été optimisés pour limiter le marquage non spécifique. Le TAMRA et MSTR sont incubés avec les ovocytes pendant 5 min à 10 μ M et le Hylite 488 est incubé pendant 15 min à 10 μ M. Tous les marquages sont réalisés à 16°C. Les enregistrements sont réalisés en tampon MES pour GLIC, et ND96 pour GlyR. Pour 5-HT₃R une solution ND96 modifiée est utilisée sans calcium avec un supplément de l'agent chélateur EGTA à 1 mM. Les enregistrements en électrophysiologie et VCF sont effectués avec un amplificateur GeneClamp 500, une interface Digidata 1440A (Axon Instrument) et le logiciel Clampex 10.3 (Molecular Devices). Les ovocytes sont clampés à un potentiel de -60 mV, et les signaux enregistrés à une fréquence de 500 Hz. En VCF, les fluorophores sont excités par une LED (CooLED pe-4000) avec la longueur d'onde adaptée (470 ou 550 nm) et la même intensité est utilisée entre les expériences. Un filtre de densité (ND 0.6 Thorlabs) est ajouté sur le trajet optique pour diminuer le photo-blanchiment et des jeux de filtres commerciaux sont utilisés pour le Hylite 488 et le TAMRA (YFP et TRITC filter set de Semrock). Un jeu de filtres spécifique pour le bimane a aussi été utilisé avec un filtre d'excitation autour de 403 nm, celui d'émission autour de 494 nm et un miroir dichroïque à 458 nm. La fluorescence est collectée à travers un objectif 40X avec une longue distance de travail et une large ouverture (LD-Plan-Neofluar 40x/0,6 Corr M27, Zeiss) monté sur un microscope inversé Axiovert 135 (Zeiss). La détection de la fluorescence est faite par un photomultiplicateur (H10722-20 Hamamatsu) relié à l'interface Digidata.

Immunofluorescence sur ovocytes

3 à 4 jours après l'injection d'ADN de récepteur + GFP, les ovocytes sont fixés à 4°C sur la nuit en paraformaldéhyde (PFA) 4%. Le marquage par immunofluorescence est effectué à température ambiante. Les sites non spécifiques sont d'abord saturés par 10% de sérum de cheval en tampon phosphate salin (PBS) pendant 30 min. Le reste du marquage est effectué à 2% de sérum de cheval. GLIC est marqué avec un anticorps de lapin anti-HA (1/200^e) pendant 1h30 puis après rinçages par un anticorps secondaire anti-lapin couplé au fluorophore AlexaFluor 645 (1/1000^e) pendant 30 min. Après rinçages, les ovocytes sont de nouveau fixés au PFA sur la nuit à 4°C. Après rinçage au PBS, ils sont inclus dans une solution d'agarose 3% *low-melting* tiède. Après durcissement de l'agarose, quelques tranches d'ovocytes de 40 μ m autour du noyau et contenant la partie foncée pôle animal sont coupées au vibratome. Après

montage sur lame les coupes sont observées au microscope à épifluorescence avec un temps d'exposition constant pour pouvoir comparer l'intensité de marquage entre les coupes.

Analyses

Pour les analyses de VCF et la construction des courbes dose-réponse, plusieurs étapes sont nécessaires. Après avoir mis la ligne de base à zéro, le ΔF doit être corrigé pour le *photobleaching*. Pour cela, la même procédure est utilisée que dans les rares cas de *rundown* de courant pendant l'enregistrement. Dans les cas de *rundown*, il arrive que le courant soit plus faible à la fin de l'enregistrement qu'au début pour la concentration de référence et c'est le cas la plupart du temps pour la fluorescence à cause du *photobleaching*. Pour corriger cela, les signaux sont normalisés à la concentration de référence en tenant compte de ce *rundown*. Lors des enregistrements, une concentration de référence d'agoniste est utilisée en début et fin d'expérience, et au moins une fois au milieu de la courbe dose-réponse. Après ces corrections, les traces sont filtrées à 5 Hz et les amplitudes de courant et de fluorescence sont mesurées à l'aide du logiciel Axograph. Pour chaque ovocyte, les données sont ajustées dans le logiciel Prism avec l'équation de Hill :

$$y(x) = \frac{I/F_{MAX} + x^{n_H}}{x^{n_H} + EC_{50}^{n_H}} \quad \text{Quenching}(dist) = \frac{Q_{MAX} + dist^{n_H}}{dist^{n_H} + Dist_{50}^{n_H}}$$

Avec x la concentration en agoniste, y la valeur de fluorescence ou de courant ; I/F_{MAX} l'intensité maximale de courant ou fluorescence, n_H le coefficient de Hill et EC_{50} la concentration d'agoniste pour atteindre la moitié de I/F_{MAX} . Les valeurs pour chaque ovocyte sont ensuite normalisées sur leur I/F_{MAX} pour pouvoir être moyennées et former la courbe dose-réponse présentée dans les figures. La même équation est utilisée pour ajuster les données de fluorescence à l'équilibre, avec cependant l'ajout d'une constante F_0 pour tenir compte du fait que la fluorescence n'est pas à zéro au début de la courbe dose-réponse. Pour les positions du bimeane sur GLIC en D136C et P250C, la courbe de quenching a tendance à changer de sens pour les valeurs de pH les plus acides (pH 3 et 3.5). L'ajustement a donc été fait en excluant cette deuxième composante à pH acide et a été réalisé dans la plupart des cas sur la gamme de pH 8 à pH 4.

Pour l'estimation des distances en angströms, une équation équivalente a été utilisée pour estimer l'amplitude de quenching en fonction de la distance C β -C β du fluorophore et du quencher (Quenching (dist) ci-dessus).

RESULTATS
PREMIERE PARTIE

Étude de la cinétique de pré-activation de GLIC par T-Jump

Cette partie est le fruit d'une collaboration avec Dietmar Pörschke, chercheur à l'Institut Max Planck de Chimie Biophysique à Göttingen en Allemagne. J'ai préparé les échantillons de GLIC et réalisé les expériences de fluorescence à l'équilibre. Les expériences de T-jump ont été réalisées par Dietmar avec les échantillons que je lui ai envoyé et il a réalisé l'ajustement multi-exponentiel des données. La conception des expériences et l'analyse des résultats ont été un travail commun.

La partie mise au point de la reconstitution de GLIC en liposomes a été faite pendant mon stage de M2 encadré par Anaïs Menny, alors doctorante dans le laboratoire et a été inclut dans la publication de son projet principal de thèse (Menny et al., 2017). C'est elle qui a mis au point l'étude par quenching de la fluorescence sur GLIC et qui a déterminé la plupart des positions du bimane utilisé sur GLIC.

La caractérisation des protéoliposomes a été faite avec l'aide d'Alexandre Chenal et de la plateforme de biophysique pour les mesures de DLS. Les images de microscopie électronique ont été faites avec le support de l'unité de Bioimagerie Ultrastructurale de l'Institut Pasteur.

Avant-propos

Comme cela a été développé dans l'introduction, une question qu'il reste à adresser est la cinétique de la pré-activation de GLIC observée via l'approche de quenching de la fluorescence du bimane. Le *stopped-flow*, une technique de mélange rapide de solution avec un temps mort de quelques millisecondes ne permet pas de résoudre la cinétique de pré-activation. La technique du T-jump couplée à la fluorescence permet de mesurer la relaxation du système par fluorescence après un saut de température avec une résolution temporelle de l'ordre de quelques microsecondes. Les atouts et le principe de cette approche ont été décrits dans l'introduction.

Pour résoudre la cinétique de pré-activation, la stratégie est de marquer un échantillon de GLIC avec le bimane à une position caractérisée pour reporter la pré-activation. Puis mesurer l'intensité de fluorescence à l'équilibre à une température et un pH donné et regarder l'évolution de cette valeur après le saut de température.

Caractérisation de GLIC en protéoliposomes

Plusieurs positions du bimane sur GLIC rapportant la pré-activation ont été déterminées précédemment comme rapporteur de la pré-activation. Dans des tests préliminaires, nous avons testé deux positions du bimane sur les cystéines P250C et D136C avec leurs quenchers respectifs Y197 et Q101W. L'amplitude du ΔF en T-jump était plus importante à pH 6 pour le P250C qui se trouve sur la boucle M2M3. Lorsque l'on augmente la concentration en protons la fluorescence du bimane en P250C augmente, et cette position rapporte le mouvement vers l'extérieur de la boucle M2M3 avec un éloignement du quencher Y197F à l'activation (Figure 1). C'est cette position qui a donc été choisie pour faire les études de T-Jump.

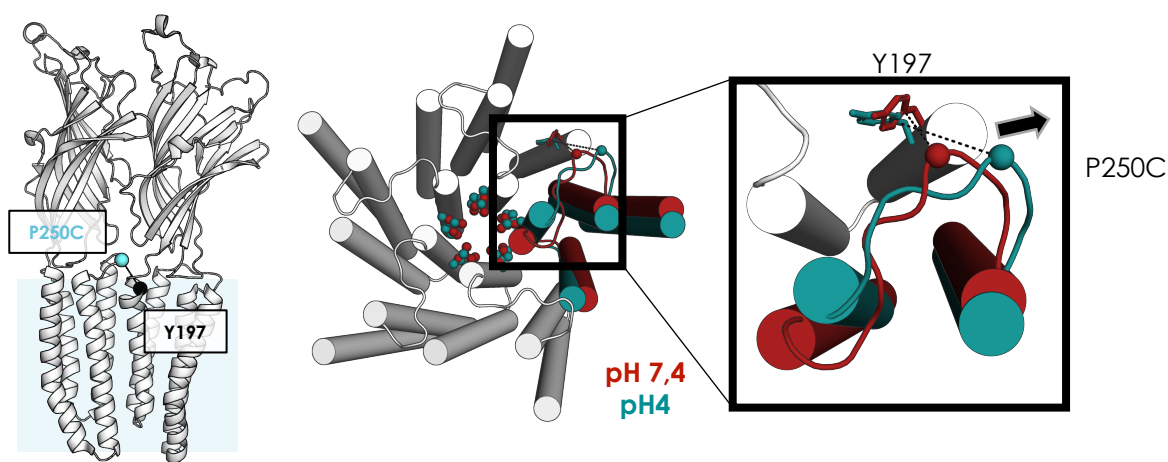


Figure 1. Position de la sonde fluorescente pour les études de T-Jump. À gauche, structure de deux sous-unités de GLIC avec en sphère bleue la position du bimane et en noir celle du quencher. Au milieu, vue du dessus des hélices transmembranaires de l'état de repos en rouge et blanc et dans l'état actif en vert. Le portail d'activation et la position du bimane en P250C sont représentés en sphère et le quencher Y197 est représenté en bâton. À droite, zoom sur une sous-unité qui permet de visualiser le mouvement de la boucle M2M3 vers l'extérieur à l'activation et l'augmentation de la distance 250-197.

Nous avons ensuite mis au point les conditions expérimentales. Il est probable que l'environnement du TMD ait un effet sur la cinétique des transitions, par conséquent les expériences ont été réalisées sur la protéine reconstituée en liposomes en l'absence de détergent. Deux mélanges de lipides ont été testés pour la mise au point de la reconstitution de GLIC en protéoliposomes : l'asolectine, extrait de soja couramment utilisé composé majoritairement de Phosphatidylcholine (POPC, utilisé dans (Menny et al., 2017)) et le mélange PEPG, mélange de Phosphatidylethanolamine (PE) et Phosphatidylglycérol (PG) qui avait été utilisé dans une publication précédente (Dellisanti et al., 2013). Cette étude a pu montrer par électrophysiologie que GLIC était fonctionnel dans ces conditions. L'asolectine avait été initialement choisie pour les études de quenching à l'équilibre car les reconstitutions étaient plus homogènes et contenaient moins de vésicules multi-lamellaires et d'agglomérats par rapport au PEPG. En effet, des mesures par diffusion dynamique de la lumière (DLS) et en microscopie électronique nous ont permis de caractériser la taille et l'aspect uni-lamellaire des vésicules (Figure 2). Les liposomes ont un diamètre d'environ 50-70 nm. Étant donné le ratio protéine-lipide, le nombre de pentamères est estimé à une quarantaine par liposome. Ces vésicules d'asolectine sont donc assez denses en protéines et des mesures de flux ionique montrent des courants pH dépendant indiquant que GLIC est fonctionnel (Menny et al., 2017). L'orientation des récepteurs est partagée avec environ 70 % des ECD à l'extérieur des

vésicules. Des mesures en *stopped-flow* sur les protéoliposomes chargés en fluorophore sensible au pH HPTS, ont permis de voir que ces protéoliposomes étaient perméables aux protons et donc tous les récepteurs étaient bien sensibles au changement de pH, indépendamment de leur orientation dans les vésicules (Figure 2).

Cependant, l'asolectine est un extrait de membranes dont la composition en lipides n'est pas maîtrisée et le mélange contient probablement des lipides protonables. Pour garder un pH stable pendant le saut de température, la reconstitution en PEPG a finalement été choisie. Les mesures en DLS des protéoliposomes en PEPG indiquent une taille similaire avec celle des protéoliposomes d'asolectine et il est probable que les caractéristiques de perméabilité et d'orientation soient également conservées.

Dans les études précédentes, GLIC était purifié dans une solution tampon Tris-NaCl et les mesures en liposomes à l'équilibre étaient réalisées en tampon phosphate salin (PBS). Différents tests de T-jump en tampon PBS ou en acide 2-(N-morpholino)éthanosulfonique (MES) ont cependant montré que le pH n'était pas stable dans ces tampons lors du saut de température. En revanche l'acide citrique s'est avéré être un tampon plus efficace du pH avant et après le saut de température et dans la gamme de pH utilisée pour observer l'activation de GLIC, de pH 8 (repos) à pH 4 (actif). C'est ce tampon citrate qui n'a pas d'effet modulateur sur la fonction de GLIC en électrophysiologie, qui a donc été utilisé pour les mesures de T-Jump.

Dans les conditions finalement utilisées pour le T-jump, GLIC est préalablement reconstitué au laboratoire en protéoliposomes de PEPG d'environ 60 nm de diamètre dans un tampon citrate (voir partie matériels & méthodes). D'après les mesures en DLS, les protéoliposomes sont stables à 4°C à pH 7,4 pendant quelques jours ce qui permet leur transport jusqu'en Allemagne. Au bout d'une semaine, une population d'objets plus gros correspondant probablement à des agglomérats est observée en DLS. Une légère centrifugation permet de sédimenter ces agglomérats et les mesures de fluorescence sont faites sur les protéoliposomes restants en suspension. Il est aussi important de noter que l'on observe sensiblement plus de gros objets à pH 5 et pH 4 où les protéoliposomes semblent être sensiblement moins stables.

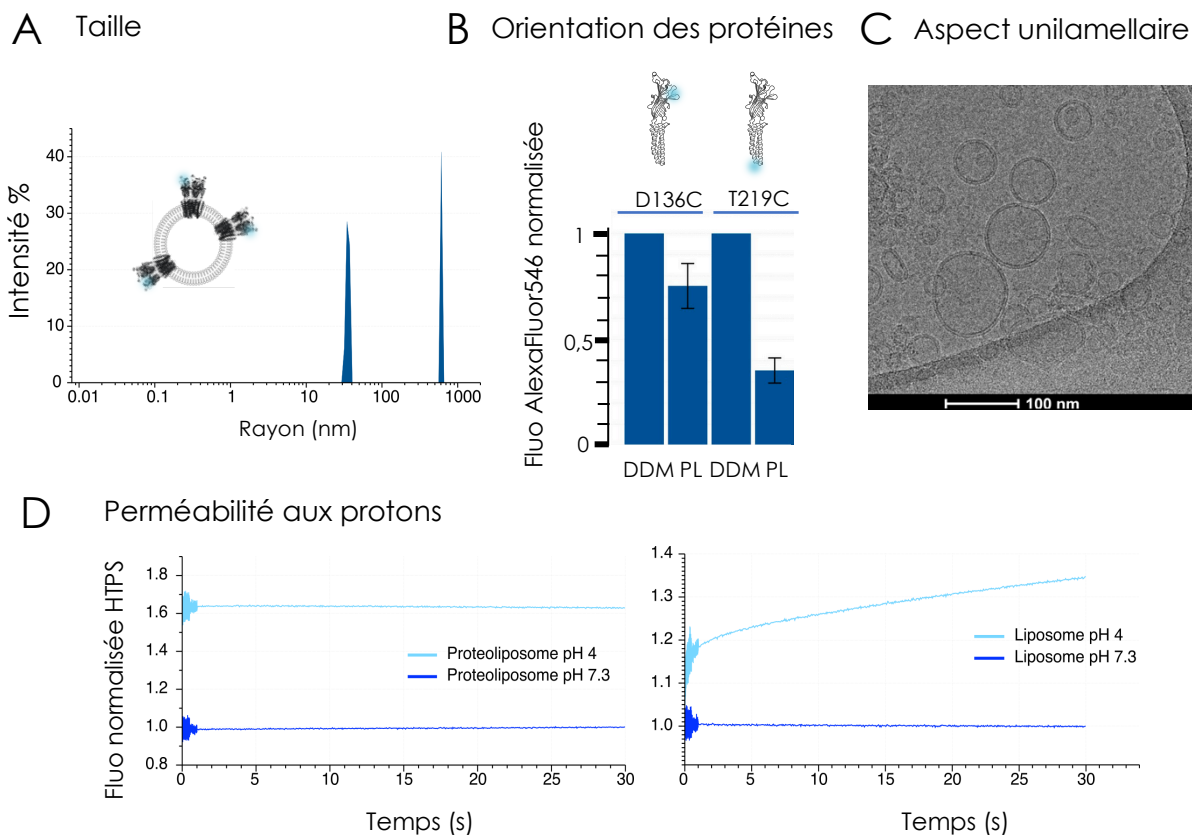


Figure 2. Caractérisation des protéoliposomes. (A) Exemple de mesure en DLS pour caractériser la taille des liposomes. Le premier pic représente la population majeure de protéoliposomes (en intensité pondérée par le rayon des objets) et le deuxième représente la population minoritaire d'agrégats. (B) Quantification par lecture de fluorescence sur gel de marquage par l'AlexaFluor546 sur GLIC en solution (DDM) ou reconstitué en liposomes (PL) avec la cystéine dans l'ECD ou en bas de l'ICD, illustrant une orientation préférentielle dans les liposomes avec l'ECD à l'extérieur à environ 70%. (C) Image en Cryo-microscopie électronique de protéoliposomes, illustrant un caractère unilamellaire majoritaire. (D) Enregistrements en stopped-flow de protéoliposomes ou de liposomes simples, remplies du fluorophore HTPS sensible au pH. La fluorescence augmente avec le changement de pH de manière instantanée pour les protéoliposomes indiquant une perméabilité aux protons alors que le pH interne des liposomes sans GLIC est plus lent à être modifier.

Mesure à l'équilibre des changements de conformation de GLIC en liposomes par fluorescence

Les mutants de GLIC marqués au bimane en P250C ont été étudiés à la fois en solution en présence de détergent n-dodécyl- β -D-maltoside (DDM), et dans deux environnements lipidiques différents en asolectine et en PEPG. Ces études ont été faites à la fois pour le mutant en présence du quencher Y197 et en son absence Y197F (La phénylalanine n'a pas d'effet de quenching sur le bimane et permet de conserver l'aromaticité du résidu). Les mesures de

fluorescence sont normalisées sur la valeur obtenue en présence de l'agent dénaturant sulfate-dodécyl-sulfate (SDS). Dans les trois cas, DDM, asolectine et PEPG, on observe une augmentation de la fluorescence dépendante du pH en présence de la tyrosine, ce changement de fluorescence rapporte le mouvement vers l'extérieur de la boucle M2M3 lors de l'activation (Figure 3). À pH 7,4, la normalisation par le SDS donne la même valeur pour les différentes conditions lipidiques indiquant qu'il n'y a pas d'effet direct des lipides sur la fluorescence. Il y a une différence de fluorescence entre le mutant en PEPG et en asolectine pour les pH les plus acides indiquant une composante supplémentaire en PEPG qui va à l'inverse du dé-quenching.

Dans le mutant de GLIC sans le quencher, on observe une diminution de la fluorescence dans toute la gamme de pH testée. Pour ce mutant, la fluorescence normalisée en SDS donne des valeurs différentes en DDM et en lipides. Cela indique que les variations de fluorescence en l'absence du quencher Y197 seraient dues à l'environnement local du fluorophore qui est fortement dépendant de l'environnement membranaire.

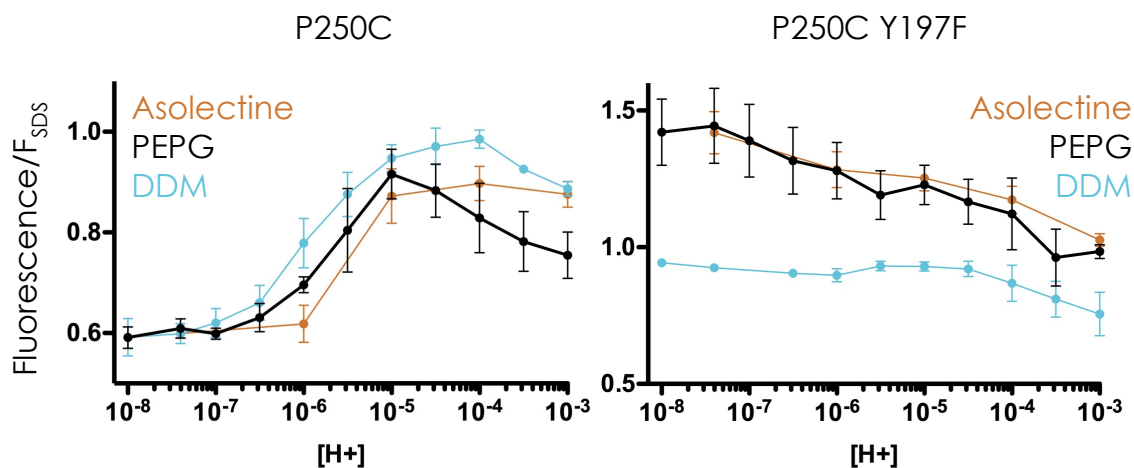


Figure 3. Fluorescence à l'équilibre en détergent et liposomes. Fluorescence du bimane en fonction du pH des mutants de GLIC marqués en P250C avec et sans quencher 197Y/F en détergent (DDM), ou liposomes (PEPG et Asolectine). Chaque point représente une mesure à un pH donné, répétée sur au moins 3 échantillons de protéines / protéoliposomes. La fluorescence est normalisée sur l'intensité de l'échantillon dénaturé en SDS.

Pour anticiper les expériences de T-Jump, des mesures à l'équilibre ont été effectuées à différentes températures. Le fluorimètre utilisé est équipé d'un Peltier pour contrôler la température qui est habituellement maintenue à 20°C. Des mesures à 10, 6 et 1.6°C ont été effectuées pour observer la variation de fluorescence avec la température (Figure 4). La variabilité des mesures est très importante notamment à 1.6°C, car il est difficile de maintenir

cette température avec le matériel disponible. Ces mesures permettent tout de même d'avoir une idée de l'influence de la température sur la fluorescence des protéoliposomes. Les valeurs de fluorescence sont normalisées à la valeur en SDS pour une température donnée. Pour le mutant avec quencher, une augmentation de température diminue l'intensité de fluorescence à pH neutre et acide. Autour de pH 5 il n'y a pas de tendance claire de changement de fluorescence et les valeurs sont dans la barre d'erreur des mesures. Pour le mutant sans quencher, on observe également une diminution de la fluorescence avec l'augmentation de la température jusqu'à pH 5 et les variations deviennent moins importantes en dessous de pH 4,5.

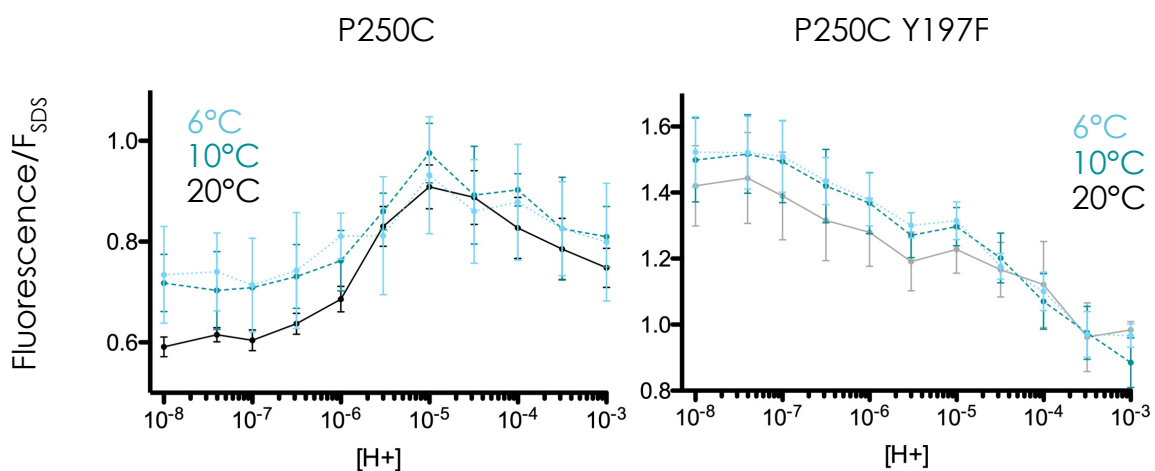


Figure 4. Influence de la température sur la fluorescence à l'équilibre. Résultats de la fluorescence du bimane en fonction du pH pour les mutants de GLIC marqués en P250C, reconstitués en PEPG.

L'influence de la température sur le bimane en solution a également été testé. Le bimane utilisé pour le marquage est le monobromobimane pour lequel le Brome (groupement partant lors de la réaction avec la cystéine) a un effet de quenching intramolécule. Les mesures ont donc été réalisées après réaction sur des cystéines libres en solution. Ces mesures montrent une légère augmentation de la fluorescence avec l'augmentation de la température à la fois dans les mesures à l'équilibre et en T-jump et ce test permet de vérifier la cohérence des observations entre les deux techniques (Figure 5). L'influence de la température sur un fluorophore est très dépendante des conditions expérimentales, et il est tout à fait possible que l'effet soit inverse sur le bimane en solution et lié à la protéine. En solution l'augmentation de la température peut augmenter l'efficacité de fluorescence du bimane. Lorsque le bimane est greffé sur la protéine, il est possible que la diminution de sa

fluorescence qui est observée soit due à l'interaction avec les résidus de la protéine, augmentant la probabilité de relaxations non radiatives à cause d'une plus grande agitation thermique. L'effet de la température sur le bimane en solution a aussi été testé en présence de tryptophane. À l'équilibre entre 6 et 20°C il n'y a pas de différence significative de la variation de fluorescence en présence ou absence de quencher. En T-jump entre 1,6 et 6°C il semble que l'augmentation de fluorescence soit plus importante en présence de tryptophane, ce qui pourrait éventuellement s'expliquer par une déstabilisation de quenching statique par l'augmentation de température. Dans la littérature, l'influence de la température et du pH sur le quenching du bimane ont été testés avec le fluorophore lié au lysozyme et indiquent qu'il n'y a pas d'effet majeur de ces deux paramètres dans la gamme de température 10 - 37°C et entre pH 7 et pH 3,5 (Brunette & Farrens, 2014).

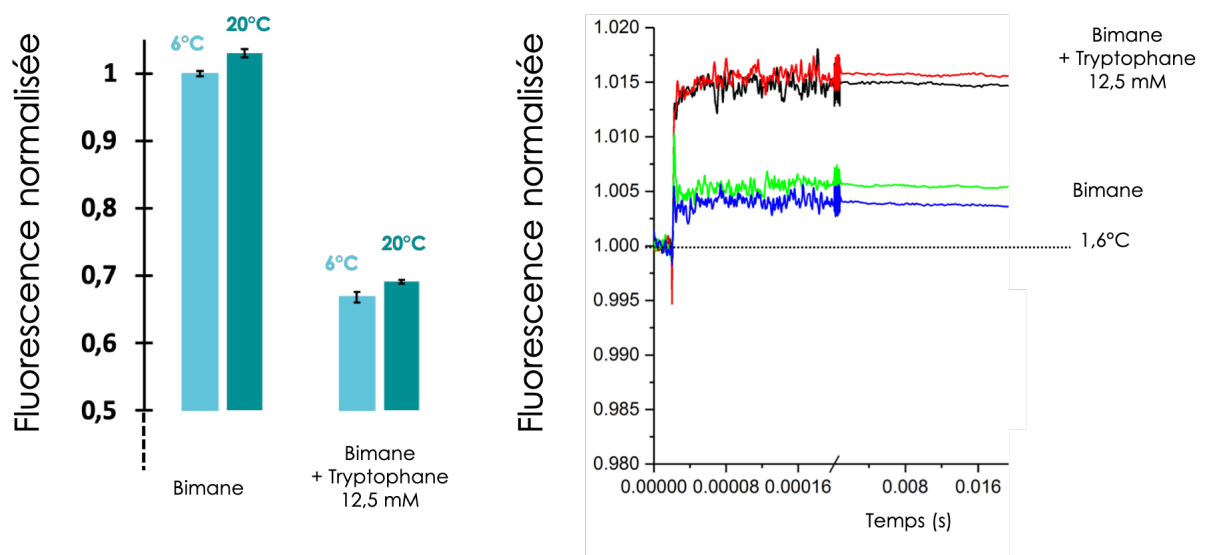


Figure 5. Influence de la température sur la fluorescence du bimane en solution. À gauche, les mesures à l'équilibre montrent une augmentation de la fluorescence avec la température en présence et en absence de tryptophane (normalisation sur l'intensité à 6°C). À droite les données en T-jump donnent une variation similaire (fluorescence normalisée sur l'intensité avant le saut de température les couleurs correspondent à deux mesures donnant des résultats similaires à pH 7,4 et pH 5).

Résolution temporelle des changements de conformation de GLIC par T-Jump

Une fois le système bien caractérisé à l'équilibre, les expériences ont été menées en T-Jump. On retrouve deux phases bien distinctes dans ces expériences qui vont dans des sens opposés, une diminution de fluorescence très rapide puis une deuxième phase beaucoup plus lente avec une augmentation de fluorescence (Figure 6). La première phase est terminée en

environ 10-15 μ s alors que la deuxième dure jusqu'à la fin de la mesure à 1,7 s. Il est difficile de continuer l'enregistrement plus longtemps car il faut alors corriger l'intensité de fluorescence pour le *photobleaching* et le refroidissement de l'échantillon.

La fluorescence est normalisée sur l'intensité de départ à 1,6°C. Lorsque l'on mesure la variation nette à la fin de la mesure de T-jump à 1,7 s, on observe une diminution pour le P250C pour la plupart des pH sauf autour de pH 4,5 où l'on voit une légère augmentation. Pour le P250C Y197F on observe également en diminution pour la plupart des pH et presque aucune différences pour les pH les plus bas. Malgré la différence de saut de températures en T-jump (1,6 - 6°C) et à l'équilibre (6 - 20°C) on observe les mêmes tendances de ΔF entre les expériences de T-jump et à l'équilibre.

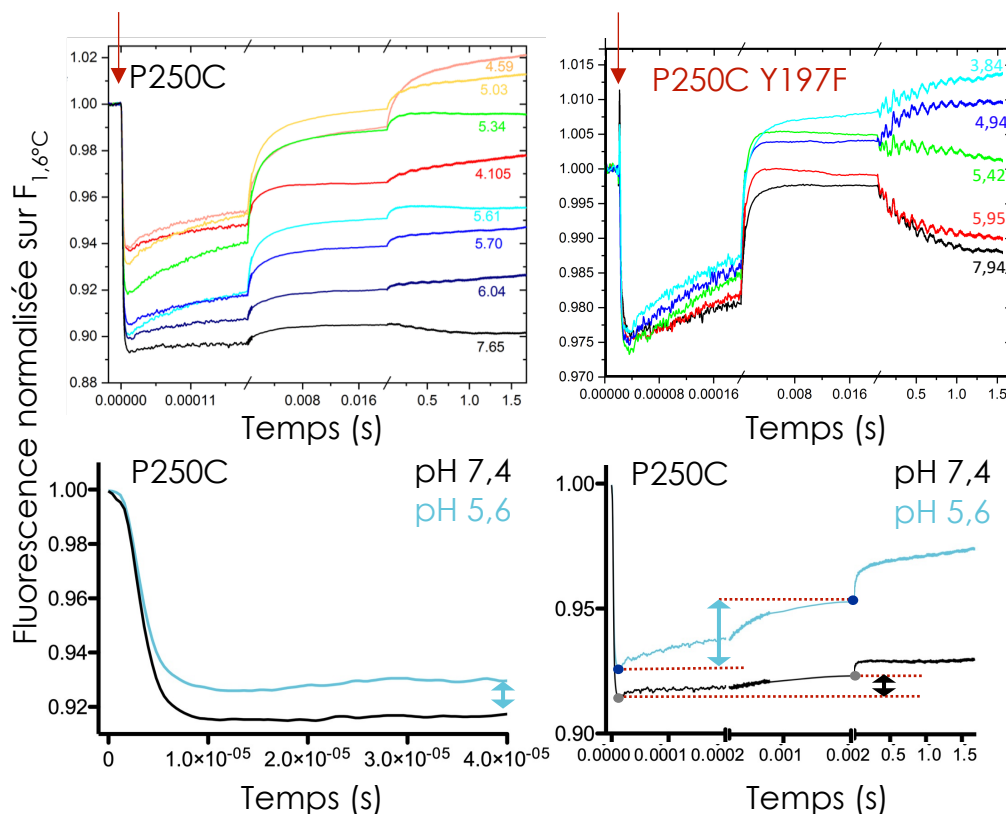


Figure 6. Relaxations mesurées en T-jump. En haut, exemple de relaxations obtenues à différents pH pour une reconstitution de P250C et de P250C Y297F, le saut de température de 1,6°C à 6°C à lieu au temps indiqué par la flèche rouge. En bas, description des mesures d'amplitudes. Deux pH de GLIC P250C sont montrés sur les 40 premières microsecondes à gauche et sur l'enregistrement complet à droite. L'amplitude de la première phase est mesurée par rapport à la valeur à pH 7 à 40 μ s (flèche bleue à gauche) ; celle de la deuxième phase est mesurée pour chaque pH entre la valeur à 40 μ s et à 20 ms (flèches bleue et noire à droite).

Les profils de relaxation sont reproductibles, mais on observe toutefois une variabilité significative pour les amplitudes des 2 phases. Cette variabilité vient probablement de la préparation biochimique, qui implique la production/purification de GLIC, la reconstitution des liposomes et un transport à 4°C suivi d'un court stockage. Pour prendre en compte cette variabilité, les expériences ont été répétées sur plusieurs reconstitutions avec différents lots de protéine purifiée, et les observations faites en T-jump ont pu être reproduites. Trois reconstitutions distinctes du mutant P250C Y197F ont été utilisées en T-jump avec à chaque fois plusieurs mesures à différents pH. Pour le mutant de GLIC P250C avec quencher six reconstitutions ont été étudiées avec plusieurs pH par échantillons et pour trois d'entre eux l'effet du propofol a été mesuré.

Première phase : relaxation intrinsèque du biman

La première phase de relaxation, très rapide, est complétée en 15-20 μ s après le saut de température selon les pH, avec une constante de temps autour de 2 μ s à tous les pH (pour avoir une mesure fiable de l'intensité de cette phase de relaxation, les amplitudes sont mesurées au plateau à 40 μ s). Cette diminution rapide de la fluorescence a déjà été observée dans des études précédentes utilisant le T-jump et elle a été attribuée au phénomène de quenching thermique induit par le changement de température (Menger, Eckstein, & Porschke, 2000). Dans ces quelques microsecondes après le saut de température, le fluorophore qui a un temps de vie de l'ordre de quelques nanosecondes a eu le temps de faire de nombreux cycles d'excitation/émission et ses propriétés intrinsèques d'efficacité d'émission de fluorescence sont celles correspondants à une température de 6°C.

La diminution de la fluorescence est indépendante du pH pour le mutant sans quencher P250C Y197F en revanche il dépend fortement du pH pour le mutant avec la tyrosine (Figure 7). Cela indique qu'un phénomène en plus du quenching thermique influence l'intensité de fluorescence pour ce mutant. Comme il a été vu dans l'introduction, le quenching est un phénomène dépendant de la température. Un quenching collisionnel va être favorisé par une augmentation de température du fait de l'agitation moléculaire. En revanche une augmentation de la température va déstabiliser le complexe fluorophore-quencher formé lors de quenching statique et va donc le défavoriser. Les vibrations moléculaires des domaines protéiques et des fluctuations des chaînes latérales sont des événements rapides qui ont lieu dans des gammes temporelles inférieures à la microseconde (Xu & Havenith, 2015). Pour le

mutant P250C Y197, l'influence de la température sur le quenching doit être prise en compte pour expliquer l'intensité de fluorescence mesurée 40 μ s après le saut de température. En présence du quencher, on voit que la diminution de fluorescence est plus importante dans l'état de repos à pH 7,4 lorsque le bimane est quenché par Y197 qu'à pH 4 où le bimane est éloigné du quencher. Cela est cohérent avec un quenching dynamique où l'efficacité de quenching par la tyrosine augmente avec la température. Ce phénomène s'ajoute donc au quenching thermique pour donner la diminution de fluorescence observée pour le mutant P250C Y197.

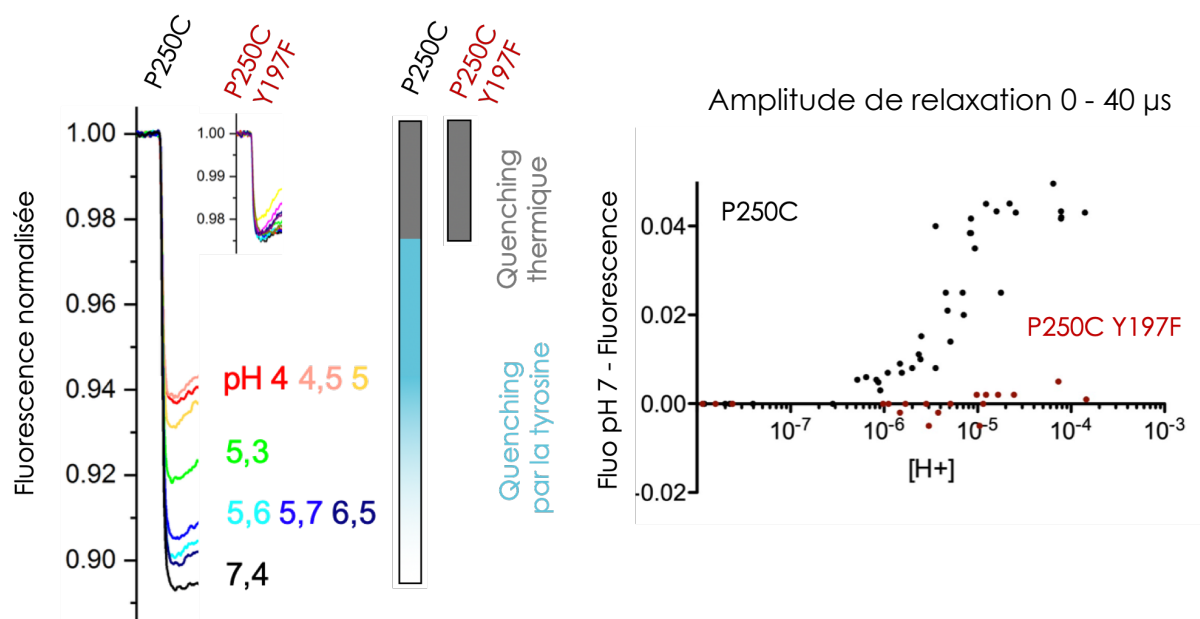


Figure 7. Première phase rapide de relaxation. À gauche données brutes du début de la relaxation suivant le saut de température à différents pH. L'amplitude de cette première phase est dépendante du pH en présence de la tyrosine, alors que sans quencher on observe seulement l'amplitude indépendante du pH qui est probablement liée au quenching thermique. À droite, les amplitudes des différentes expériences de T-jump sont mesurées en fonction du pH. L'amplitude mesurée à 40 μ s après le saut de température est soustraite à la valeur obtenue à pH 7.

Dans les premières 40 μ s, les changements de conformations liés à la relaxation de la protéine n'ont pas eu le temps d'avoir lieu, et on peut considérer que la population de récepteur est toujours dans l'équilibre correspondant à 1,6°C. Les différences d'intensité de fluorescence en fonction du pH du mutant P250C Y197 sont donc un moyen indirect de mesurer l'équilibre allostérique à 1,6°C. La courbe d'amplitude de fluorescence en fonction du pH de la première phase mesurée en T-jump est superposable à celle de dé-quenching mesuré à l'équilibre à 20°C (Figure 3). En ajustant les données de fluorescence en fonction du

pH avec une équation de Hill (cf. matériels & méthodes) on trouve un pH_{50} (EC_{50} exprimé en unité de pH) autour de pH 5,72 pour les données à l'équilibre à 20°C et de pH 5,55 pour les valeurs issues de la première phase de T-jump reflétant à l'équilibre à 1,6°C.

Il semblerait donc que l'augmentation de température déplace légèrement la courbe dose-réponse du proton vers les plus hautes concentrations. Le fait que l'amplitude de cette phase rapide de diminution de la fluorescence soit indépendante du pH pour le mutant P250C Y197F est une indication supplémentaire que le ΔF observé à l'équilibre pour ce mutant n'est pas lié à du quenching. Cette première phase ne donne pas d'information en elle-même sur la relaxation de GLIC mais est tout de même informative pour la caractérisation de l'équilibre à 1,6°C.

Deuxième phase : relaxation allostérique de la protéine

La deuxième phase de relaxation plus lente de 40 μs environ jusqu'à 1,7 s comporte un grand nombre de composantes temporelles. On peut d'abord regarder l'amplitude de cette phase de relaxation en fonction du pH (Figure 8). Pour éviter les incertitudes des mesures de T-jump causées par le *photobleaching* et le refroidissement de l'échantillon, les mesures d'amplitudes sont faites entre 40 μs et 20 ms. Pour le mutant P250C Y197 on observe un maximum d'amplitude entre pH 4,8 et 5,3 selon les essais.

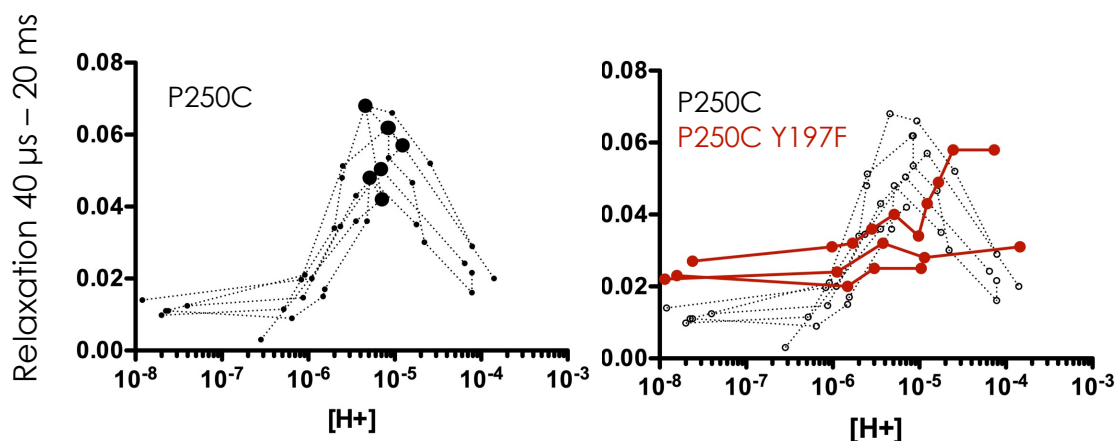


Figure 8. Amplitude de la relaxation en fonction du pH. À gauche, amplitude de la deuxième phase de relaxation entre 40 μs et 20 ms pour toutes les expériences du mutant P250C. Les points venant d'un même échantillon sont reliés et les sphères plus larges indiquent le maximum de relaxation pour chaque reconstitution. À droite les trois expériences du mutants P250C Y197F sont superposés aux données du mutant P250C.

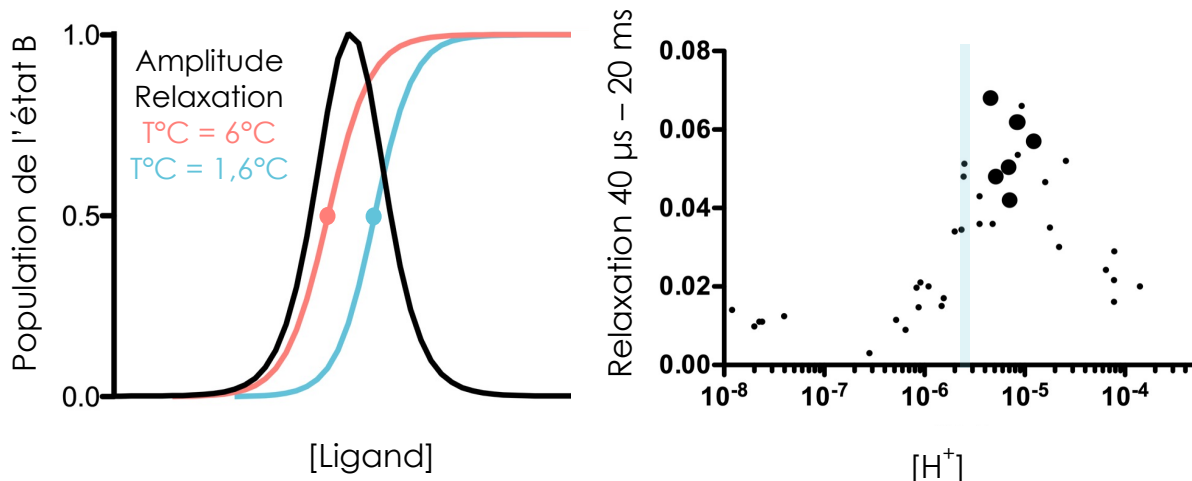
À des concentrations plus importantes en protons, on voit ensuite une diminution de l'amplitude de relaxation. Pour le mutant sans quencher P250C Y197F, on observe une

augmentation de cette amplitude avec l'acidification. L'amplitude de cette phase de relaxation est très variable pour P250C Y197F et suggère une variabilité des échantillons.

Corrélation entre pH₅₀ et amplitude de relaxation

Comme cela a été brièvement décrit dans l'introduction, lors des expériences de T-jump, on s'attend à ce que l'amplitude de relaxation soit maximale au niveau de l'EC₅₀ de la transition allostérique observée. Pour illustrer cette prédiction, on peut considérer un modèle allostérique à deux états A et B avec un décalage causé par la température, de la courbe de population de l'état B en fonction de la concentration en ligand (Figure 9). Dans cet exemple, l'augmentation de la température favorise la transition et donne une courbe d'apparition de l'état B décalé vers les plus faibles concentrations de ligand. L'amplitude de relaxation en T-jump qui correspond à la ré-équilibration correspond à la différence entre les deux courbes et l'amplitude est maximale entre les deux EC₅₀ des courbes correspondants aux deux températures. Dans notre cas, la courbe de dé-quenching à 1,6°C est estimée sur la base de la première composante. La courbe à 6°C peut être estimée à partir de la valeur de fluorescence à la fin de la mesure de T-jump qui est l'équivalent d'une mesure à l'équilibre à 6°C. Le pH₅₀ pour cette estimation est intermédiaire entre celui estimé à 1,6°C et celui à 20°C et il est autour de pH 5,65. Avec ces pH₅₀ de 5,55 (1,6°C) et 5,65 (6°C) le maximum de relaxation devrait théoriquement se retrouver entre les deux valeurs.

La tendance générale des résultats expérimentaux correspond à ce qui est attendu pour le mutant P250C avec une augmentation de l'amplitude de relaxation autour du pH₅₀ de la transition puis une diminution aux pH plus acides (Figure 9). Pour ce mutant cela confirme que l'on regarde la transition correspondant au mouvement de la boucle M2M3 observé lors de la pré-activation. Sans le quencher, on observe un changement de fluorescence qui n'est pas dû à cette transition puisque le maximum de relaxation se trouve aux pH les plus acides. La relaxation observée peut être due à l'interaction avec les lipides par exemple, ou bien à la protonation/dé-protonation de résidus environnants le fluorophore.



	1,6°C valeurs composante rapide	6°C valeurs nettes à la fin du T-jump	20°C Valeurs mesurées à l'équilibre
pH50	5,55 +/- 0,18	5,65 +/- 0,06	5,72 +/- 0,11
nH	2,47 +/- 0,80	3,55 +/- 1,57	1,50 +/- 0,39
n	3	4	7

Figure 9. Maximum d'amplitude de relaxation. À gauche, les courbes en couleurs représentent la population de l'état B pour chaque température. L'amplitude maximale théorique de relaxation est atteinte pour une concentration en ligand entre les deux EC₅₀. À droite, la relaxation de GLIC P250C Y197 est superposée à la gamme de pH où devrait se retrouver le maximum de relaxation entre les EC₅₀ à 1,6 et 6°C (zone bleue). Le tableau récapitule l'estimation des EC₅₀ et coefficients de Hill pour chaque température. Les ajustements sont faits séparément pour chaque reconstitution.

La relaxation mesurée dans cette deuxième phase de relaxation présente les caractéristiques attendues de la pré-activation. En regardant en détails, le maximum d'amplitude de relaxation pour le P250C est plutôt autour de pH5 - 5,2 ce qui ne correspond pas tout à fait à la valeur prédite entre 5,55 et 5,65. Ce décalage peut s'expliquer par une imprécision dans l'estimation des pH₅₀. Ou bien par la présence d'un phénomène supplémentaire qui ne seraient pas directement liés à l'activation de GLIC mais causée par le changement de température et qui aurait lieu sur la même gamme temporelle que la pré-activation, comme c'est le cas pour le mutant P250C Y197F.

Le propofol confirme la nature de la relaxation

Pour confirmer la nature de la relaxation observée en P250C, une expérience complémentaire a été menée en présence du propofol, un anesthésique qui inhibe l'activité de GLIC en se liant à plusieurs sites du domaine transmembranaire. Dans les mesures par

fluorescence, le propofol inhibe également la pré-activation. En effet, en position P250C le dé-quenching du bimeane avec l'augmentation de la concentration de protons est inhibé par la présence du propofol. En comparant l'effet du propofol sur la fluorescence en P250C dans différentes préparations, on voit que cet effet inhibiteur est conservé en détergent et en liposomes (Figure 10).

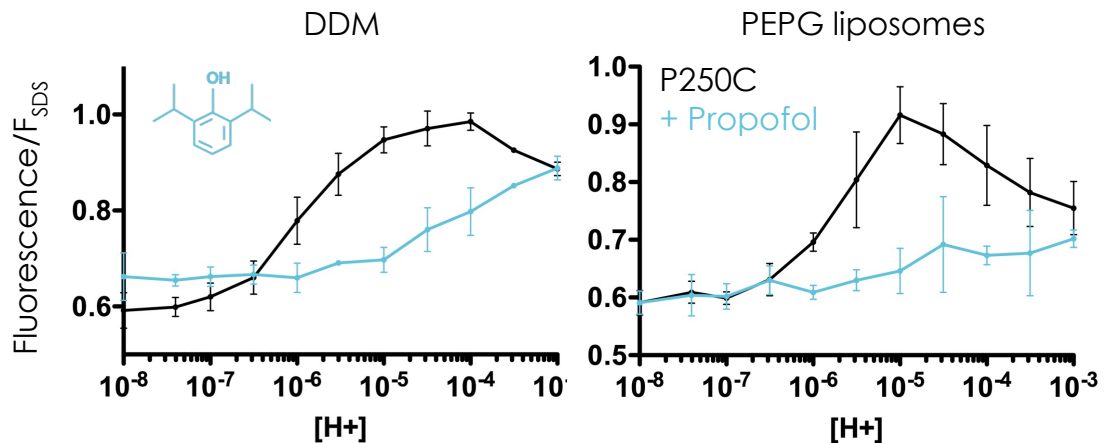


Figure 10. Effet du propofol sur la fluorescence à l'équilibre. Mesures à l'équilibre à 20°C de GLIC P250C en détergent et reconstitué en liposomes PEPG avec et sans propofol à 100 μ M.

Des expériences de T-jump à différents pH ont été réalisées en présence de propofol à 100 μ M. On observe toujours la première phase très rapide mais son amplitude ne change presque pas avec le pH, elle reste égale à celle observée à pH 7,4 (Figure 11). En revanche la phase de relaxation plus lente est quasiment inexistante en présence de propofol à tous les pH testés. Ces résultats sont une indication forte que la relaxation mesurée en fluorescence reflète principalement la transition de GLIC entre l'état au repos et l'état-pré-actif.

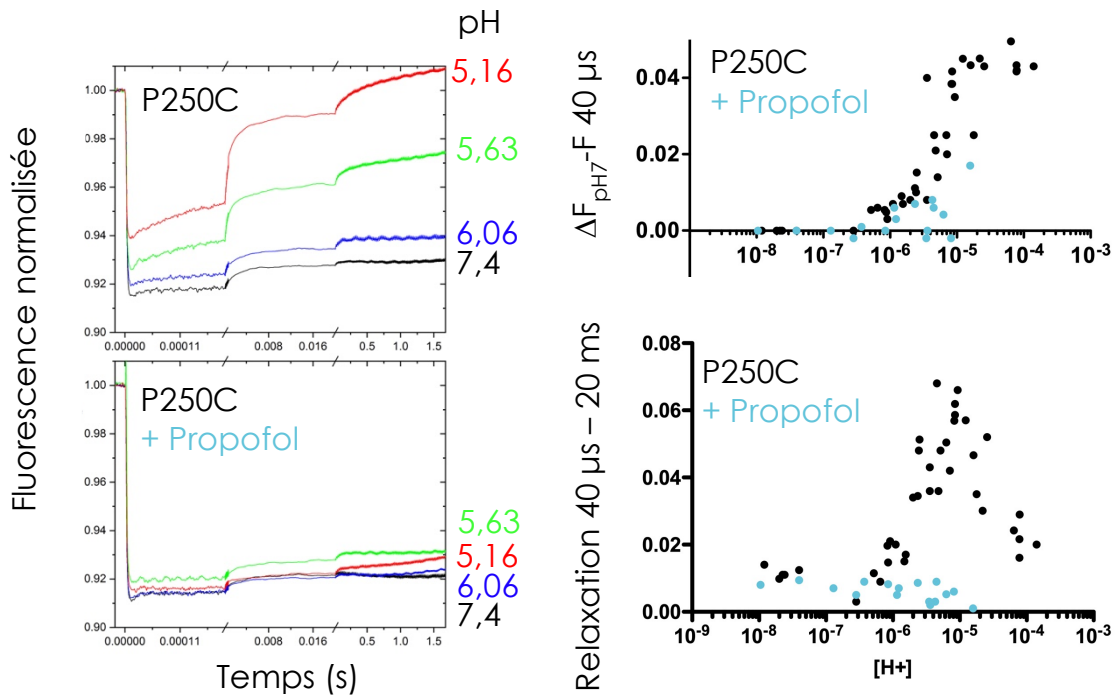


Figure 11. T-jump en présence de propofol. À gauche données brutes de la relaxation suivant le saut de température sans et avec propofol. À droite, amplitude de la première phase de relaxation entre 0 et 40 μs et la deuxième entre 40 μs et 20 ms pour toutes les expériences (P250C $n=6$; P250C+propofol $n=3$).

Analyses cinétiques

L'ajustement des données de T-jump à l'aide de fonction exponentielles est complexe. Les événements de relaxation se déroulent sur une large gamme temporelle d'au moins 5 cinq ordres de grandeur et les ajustements multi-exponentiels réalisés par Dietmar donnent selon les pH de 3 à 7 composantes (Figure 12). Étant données ces observations, il est difficile de faire une analyse cinétique précise en ne connaissant pas la nature exacte de chaque processus ayant lieu dans les différentes gammes temporelles. Néanmoins, on peut observer une gamme de constantes de temps τ pour laquelle l'amplitude est dépendante du pH. Autour de 350 μs cette composante est 1,5 à 2 fois plus importante pour les pH 5 ;5,3 et 5,5 qui sont dans la gamme de pH autour du p*H*50 pour lesquels on s'attend à une plus grande amplitude de relaxation. Une composante autour de 3 ms est également présente et son maximum d'amplitude est observé pour les pH 5 et 5,3. Les principales réorganisations conformationnelles liées à la pré-activation auraient donc lieu dans la gamme temporelle de 350 μs à 3 ms.

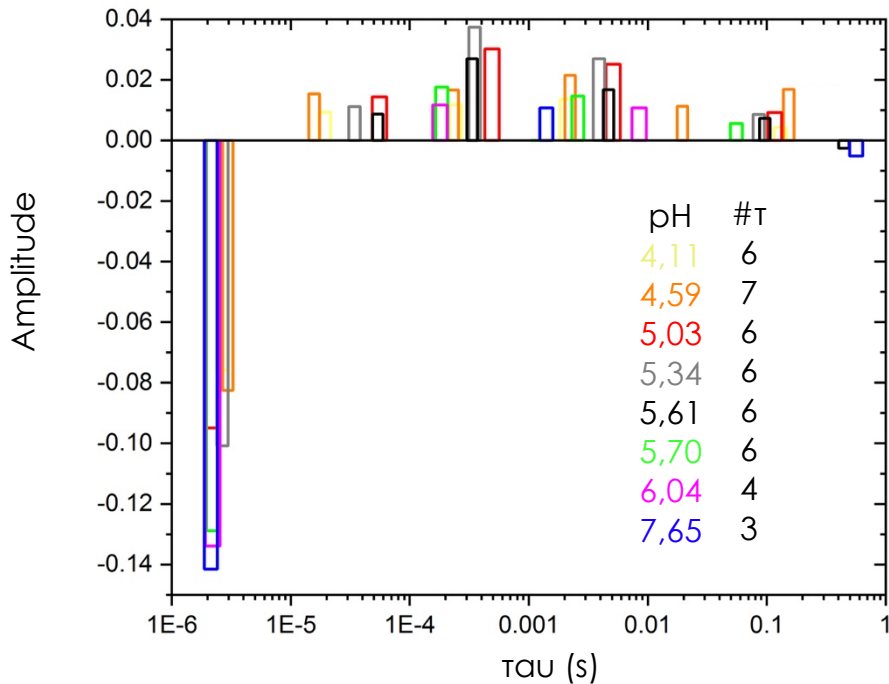


Figure 12. Analyse des cinétiques de relaxation. Un ajustement multi-exponentiel des données de relaxation donne entre 3 et 7 constantes de temps selon les pH.

Discussion

Les mesures de T-jump permettent d'observer la cinétique du changement de conformation reporté par la position P250C de GLIC reconstitué en liposomes. Avec les estimations des pH_{50} , on observe que l'augmentation de la température favorise la pré-activation de GLIC. Ces mesures montrent une relaxation multi-exponentielle, plus compliquée qu'attendu sur une large gamme temporelle indiquant une relaxation complexe impliquant potentiellement plusieurs phénomènes. On peut néanmoins observer deux composantes principales autour de 350 μ s et 3 ms qui sont toutes les deux absentes lors de la relaxation en présence de propofol ce qui indique que ces relaxations sont spécifiques de la transition de GLIC.

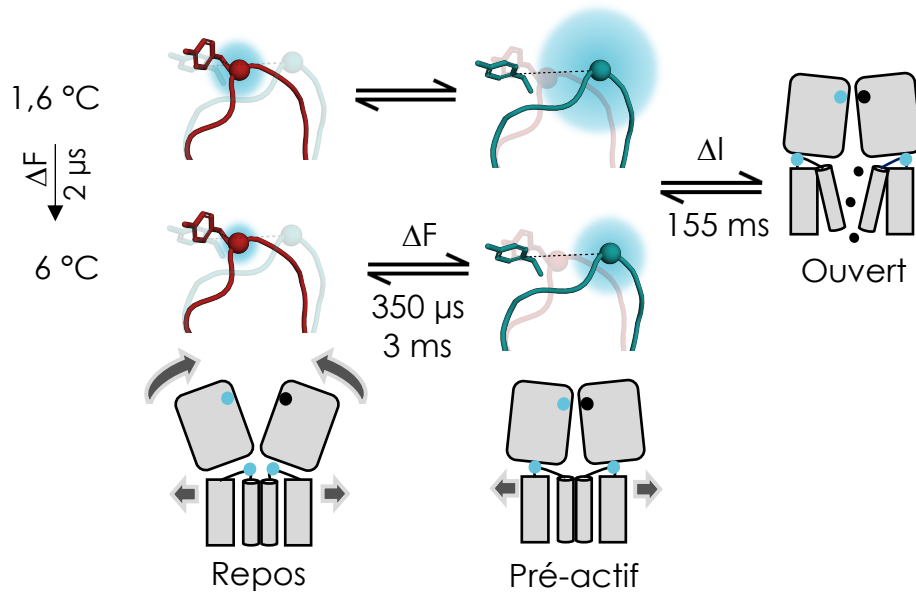


Figure 13. Schéma récapitulatif des phénomènes observés dans l'expérience de T-jump. En quelques microsecondes après le saut de température, la fluorescence intrinsèque du bimanche change et l'agitation thermique augmente le quenching collisionnel avec la tyrosine 197. Dans la gamme de 40 μ s à 20 ms la relaxation observée correspond aux changements de conformations de GLIC. Dans la gamme de temps plus longues de 50 -200 ms, le mouvement de M2 permet l'ouverture du canal et l'activation. Les constantes de temps estimées et tirées de la littérature pour l'activation sont affichées sous les flèches.

Dans le mutant sans quencher P250 Y197F, une relaxation multi-exponentielle est également observée dans une gamme temporelle similaire à celle où l'on observe la pré-activation. Dans ce mutant, Y197 le quencher principal de P250C est absent mais les variations de fluorescence peuvent être dues à d'autres quenchers, au changement d'environnement causé par la mutation ou à des interactions avec des lipides. La structure de GLIC P250C Y197F à pH 4 a récemment été publiée (Hu, Ataka, et al., 2018). Elle montre que la chaîne latérale de la phénylalanine en 197 n'adopte pas la même orientation que la tyrosine dans la plupart des structures de GLIC. La tyrosine est dirigée vers la boucle M2M3 de la sous unité adjacente alors que la phénylalanine fait face à la cavité intra sous-unité. Cette différence d'orientation illustre les changements structuraux provoqués par la mutation, ce qui complique les interprétations structurales. Le contrôle le plus convaincant est donc l'expérience en présence de propofol.

Il est difficile d'extrapoler les cinétiques observées à 6°C à des températures physiologiques, mais il est intéressant de comparer ces cinétiques avec les expériences précédentes menées en *stopped-flow* qui ont été faites à 20°C. Le changement de fluorescence en *stopped-flow* pour GLIC P250C a été mesuré sur une période de 30 s. L'analyse

de répartition (*binning*) indique que la majorité du ΔF (72%) a lieu dans les 5 ms qui suivent le changement de pH, puis une composante non négligeable du ΔF a lieu avec une constante de temps caractéristique autour de la seconde (Figure 14). Ce résultat est comparable avec les données de T-jump, 5 ms après le saut de température, 63% de la relaxation a eu lieu pour un exemple à pH 5,63. Les expériences de *stopped-flow* ont été menées à 20°C, il est donc possible que la relaxation observée en T-jump à 6°C soit un peu plus lente.

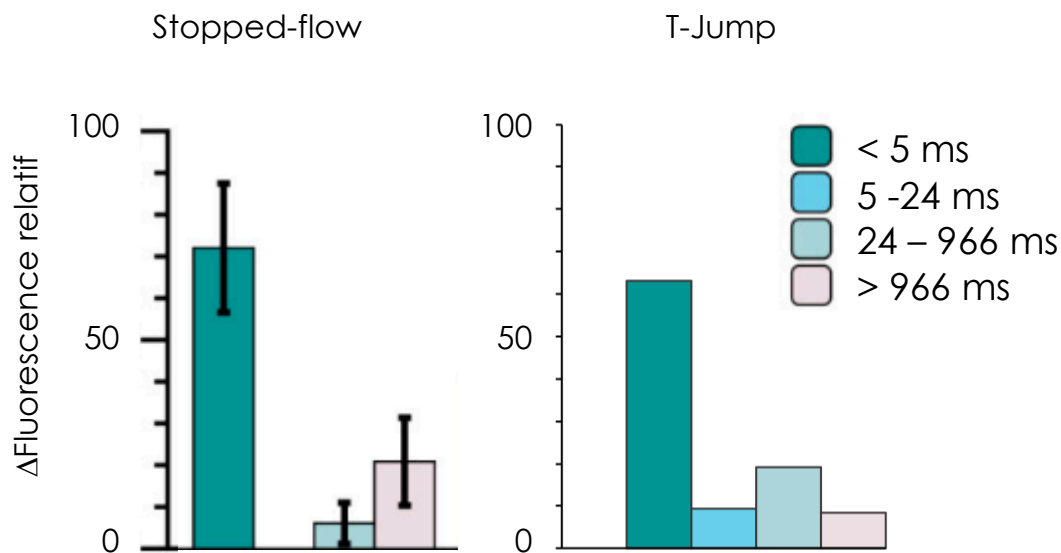


Figure 14. Comparaison des données de T-jump avec les mesures précédemment obtenues en stopped-flow. Plus de 60% du changement de fluorescence a eu lieu dans les 5 premières millisecondes à la fois dans les expériences de T-jump et de stopped-flow. Les enregistrements de stopped-flow ont été réalisés en liposomes d'asolectine à 20°C et peuvent expliquer les variations dans les gammes de temps plus grandes.

Si l'on considère que la pré-activation à température ambiante est encore plus rapide que celle mesurée en T-jump, alors la différence de cinétique entre l'activation (155 ms) et la pré-activation (centaines de μs à la dizaine de ms) est de plusieurs ordres de grandeur. Il a été montré dans les études précédentes de quenching sur GLIC que la plupart des réorganisations de l'ECD et de l'interface ECD-TMD ont eu lieu lors de la pré-activation. Les étapes limitantes pour l'activation sembleraient donc être le mouvement de l'hélice M2 qui permet d'ouvrir le canal et l'hydratation de ce canal pour permettre le passage des ions. Les récepteurs eucaryotes ayant une activation beaucoup plus rapide, cela voudrait dire que l'étape limitante pour GLIC se trouve dans le TMD. Pour tester cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier en canal unique la cinétique d'activation de chimères constituées de l'ECD de GLIC et d'un TMD eucaryote qui devrait être plus rapides que celles de GLIC.

Dans l'étude d'électrophysiologie en perfusion rapide menée sur GLIC, ELIC et les GABA_AR, les auteurs évaluent la constante d'activation de GLIC à 155 ms et celle du GABA_AR deux ordres de grandeur plus rapide, autour de 0,8 ms (Laha et al., 2013). Il est intéressant de noter que la cinétique de pré-activation de GLIC serait légèrement plus rapide que l'activation du GABA_AR. À partir de cette observation on peut imaginer plusieurs hypothèses pour expliquer le fait que l'activation des récepteurs eucaryotes soit beaucoup plus rapide. Soit les récepteurs eucaryotes présentent aussi une pré-activation aussi rapide que GLIC mais ont une ouverture du canal beaucoup plus efficace, soit la pré-activation est beaucoup plus rapide chez les eucaryotes en comparaison avec GLIC et l'étape d'ouverture est également l'étape limitante cinétiquement chez les eucaryotes. La géométrie du TMD des procaryotes a une forme assez différente de celle des eucaryotes avec un évasement plus important en haut du TMD. Cette différence de morphologie pourrait induire des modulations par les lipides et modifier la cinétique d'ouverture du canal.

Il serait intéressant d'appliquer cette méthode de T-jump aux récepteurs eucaryotes et aux chimères procaryotes-eucaryotes pour avoir d'avantages d'informations sur les cinétiques d'activation et de pré-activation de ces récepteurs.

RESULTATS
DEUXIEME PARTIE

Étude de l'effet structural de mutations et modulateurs sur les transitions de GLIC par quenching de la fluorescence

Cette partie s'inscrit dans la continuité du travail de thèse d'Anaïs Menny qui a mis au point l'approche de quenching par les tryptophanes sur GLIC. Ses résultats ont servi de base pour le développement de cette étude, et certains mutants de GLIC ont été réutilisés. La publication de ce travail est en cours de préparation.

Pour cette partie, je tiens aussi à souligner l'aide précieuse de Karima Medjebeur, technicienne dans notre équipe, qui m'a aidé dans la production et la purification des nombreux mutants de GLIC qui ont été utilisés

Avant-propos

L'étude précédente de GLIC utilisant l'approche de quenching de la fluorescence du bimane par les tryptophanes a permis de mettre en évidence plusieurs mouvements de GLIC lors de la transition de pré-activation. L'objectif de cette partie est d'établir, en exploitant cette méthode, les bases mécanistiques de l'effet des modulateurs et des mutations allostériques. En utilisant les paires de quenching développées pour mesurer les changements de conformations, on pourra mieux comprendre l'impact des mutations et modulateurs sur les réorganisations structurales des RCPs. Avec cette approche en fluorescence, on pourra distinguer si les mutations affectent d'avantage la pré-activation ou les étapes subséquentes qui conduisent à l'ouverture du canal. Le modèle MWC détaillé dans l'introduction, permet de décrire le fonctionnement des protéines allostérique et s'est avéré être un bon modèle pour détailler le fonctionnement des RCPs. Il prévoit que les réorganisations sont concertées et donnent lieu à un couplage entre les différents sites fonctionnels du site orthostérique, du canal ionique et des site allostériques. La combinaison de l'approche par fluorescence et des perturbations introduites par les mutations et modulateurs permettra d'appréhender ces prévisions.

Parmi les paires de quenching caractérisées, 3 rapportent le mouvement de compaction du domaine extracellulaire pendant la pré-activation. Une autre mesure le rapprochement des boucles 2 et F en bas de l'ECD et une dernière rapporte le mouvement de la boucle M2M3. La compaction du domaine extracellulaire est un mouvement clé dans la transition de GLIC et elle est rapportée par le bimané en position R133C, V135C et D136C. En V135C, le changement de fluorescence est bi-phasique et un changement de la courbe de ΔF sera difficile à interpréter selon si l'effet est sur la première ou la deuxième phase. En R133C et D136C, une large amplitude de ΔF est observée en présence de quencher et les deux positions rapportent le rapprochement des boucles B et E. Le mutant D136C marqué ou non au bimané et combiné au quencher Q101W a une fonction très proche du récepteur sauvage. C'est le mutant qui a été choisi pour regarder l'influence des mutations sur la compaction du domaine extracellulaire. L'autre réorganisation clé est le mouvement de la boucle M2M3 et comme cela a été exposé dans la partie précédente, c'est le bimané en position P250C qui permet de rapporter ce mouvement (Figure 1). Le mutant P250C Y197 marqué au bimané

présente toutefois une perte de fonction significative avec une diminution de la sensibilité au proton de 0,5 unité de pH.

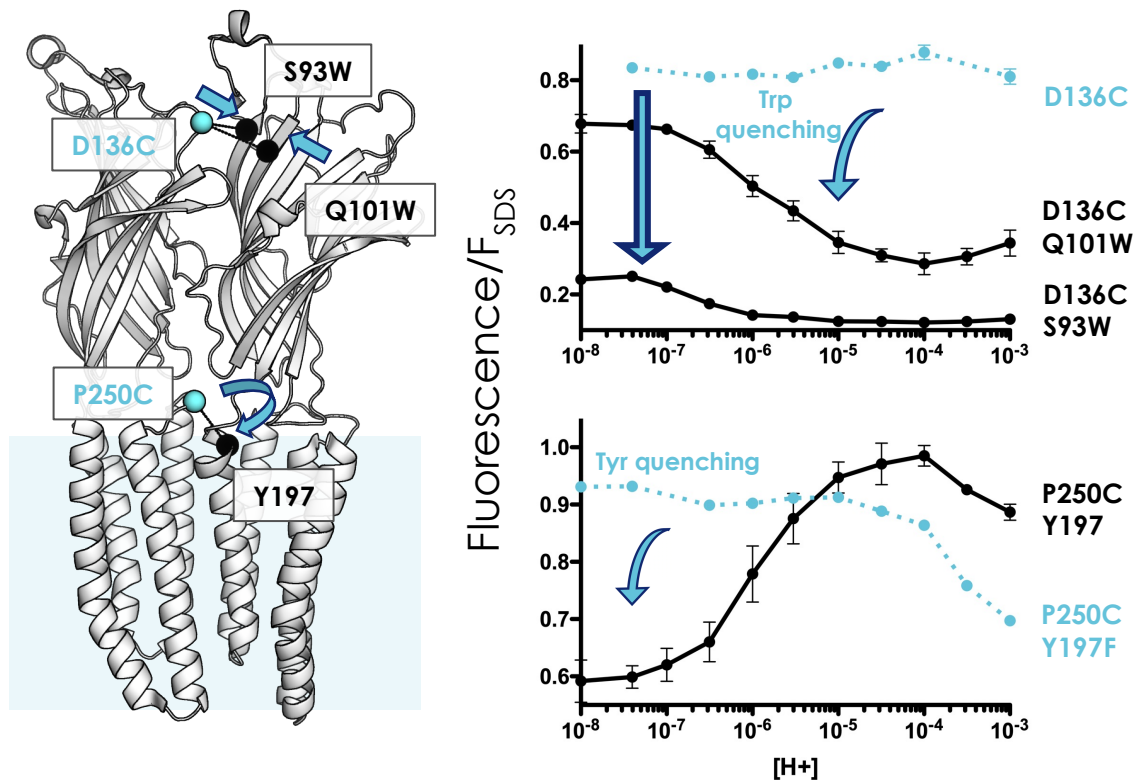


Figure 1. Position des senseurs de la pré-activation. À gauche, structure de deux monomères de GLIC avec la localisation en sphères bleues des mutations en cystéines où le bimane réagit et en noir la position des quencher Trp ou Tyr. À droite, fluorescence à l'équilibre en fonction du pH du bimane greffé sur GLIC en détergent pour les deux positions avec et sans quencher. La première position mesure la compaction de l'ECD avec une diminution de la fluorescence et donc un rapprochement entre D136C et Q101W avec l'augmentation de la concentration en protons (S93W étant plus proche, le quenching est déjà presque maximal à pH 7). La deuxième position mesure le mouvement vers l'extérieur de la boucle M2M3 avec un dé-quenching dû à l'éloignement entre P250C et Y197.

Pendant mon master effectué au laboratoire, j'ai pu optimiser la reconstitution de GLIC en liposomes pour les mesures en fluorescence. Pour les positions sélectionnées D136C P250C, les ΔF mesurés sont similaires en détergent et en liposomes d'asolectine indiquant une conservation des mouvements observés dans ces différents environnements membranaires. Les reconstitutions en liposomes demandant une quantité plus importante de protéine, et présentant parfois une hétérogénéité dans les mesures de fluorescence (cf. partie précédente avec le T-jump), les mesures pour ce projet ont donc été réalisées sur protéine purifiée en détergent.

Les mutations allostériques étudiées ont été identifiées dans des études précédentes du laboratoire (Nemecz et al., 2017; Prevost et al., 2012; Sauguet et al., 2014). Il est important de vérifier que leur effet est similaire en présence des mutations cystéine, tryptophane et après le marquage par le bima. La fonction des mutants étudiés a donc systématiquement été testée par électrophysiologie ou par immunofluorescence pour vérifier l'expression à la membrane du récepteur dans le cas de mutants qui ne présentaient pas de courant en électrophysiologie.

Mouvements concertés de pré-activation, révélés par des mutations allostériques partielles

Caractérisation des mutations perte de fonction D32E H235Q et E222Q

Avec la résolution de GLIC à pH 7 et pH 4, il a été possible de comparer ces structures représentant l'état au repos et actif et cela a permis d'identifier des interactions critiques pour la stabilisation de l'état actif (Sauguet et al., 2014). Parmi elles, on trouve un pont salin à la base de l'ECD entre l'aspartate 32 et l'arginine 192 qui est formé dans l'état actif suite au rapprochement des boucles 2 et pré-M1. La perturbation de ce pont salin donne un phénotype de perte de fonction du récepteur qui peut être partielle (D32E), ou totale (D32N R192Q). Les mutations sont appelées perte de fonction partielle lorsqu'elle produisent un phénotype pour lequel la sensibilité au proton du récepteur est diminuée d'au moins 0,5 unité de pH. Les mutations perte de fonction totale indique que les récepteurs, malgré une expression robuste à la membrane, ne présentent pas de courant en électrophysiologie.

Deux autres mutations perturbant la fonction ont été sélectionnées au milieu et en bas de M2, H235Q et E222Q. Ces deux résidus titrables histidine et glutamate étaient des candidats potentiels pour être des senseurs de protons de GLIC (Nemecz et al., 2017). Mais les analyses de mutagenèse suggèrent plutôt que leur mutation perturbe l'équilibre allostérique. Dans les deux cas, ces mutations provoquent une perte de fonction partielle. L'histidine 235 est localisée au milieu de l'hélice M2, orientée vers l'intérieur de la sous unité. Il est probable qu'elle stabilise l'état ouvert via des interactions ioniques et des liaisons hydrogènes avec M3 et M1 qui sont visibles dans la structure à pH 4. On observe une interaction directe de H235 avec le carbonyle de I259, et d'autres indirectes via une molécule d'eau avec le carbonyle de M205 et l'hydroxyle de Y266. Le glutamate 222 est lui situé tout

en bas de M2, orienté vers le centre du canal et forme un des points de constriction. Sa mutation en alanine a montré une différence de sélectivité du canal aux ions monovalents, mais la structure à pH 4 donne une conformation identique au récepteur sauvage (Hilf & Dutzler, 2009). Des mutants de GLIC contenant ces mutations fonctionnelles combinées aux mutations C27S, D136C et Q101W ont été marqués au bimane et enregistrées en électrophysiologie. Dans les trois cas, l'effet perte de fonction des mutations décrit dans la littérature est conservé, avec un déplacement de pH_{50} similaire, excepté pour la mutation E222Q qui a un effet légèrement moins important sur le fond cystéine/bimane/tryptophane que sur le récepteur sauvage (Figure 2 & tableau Figure 3).

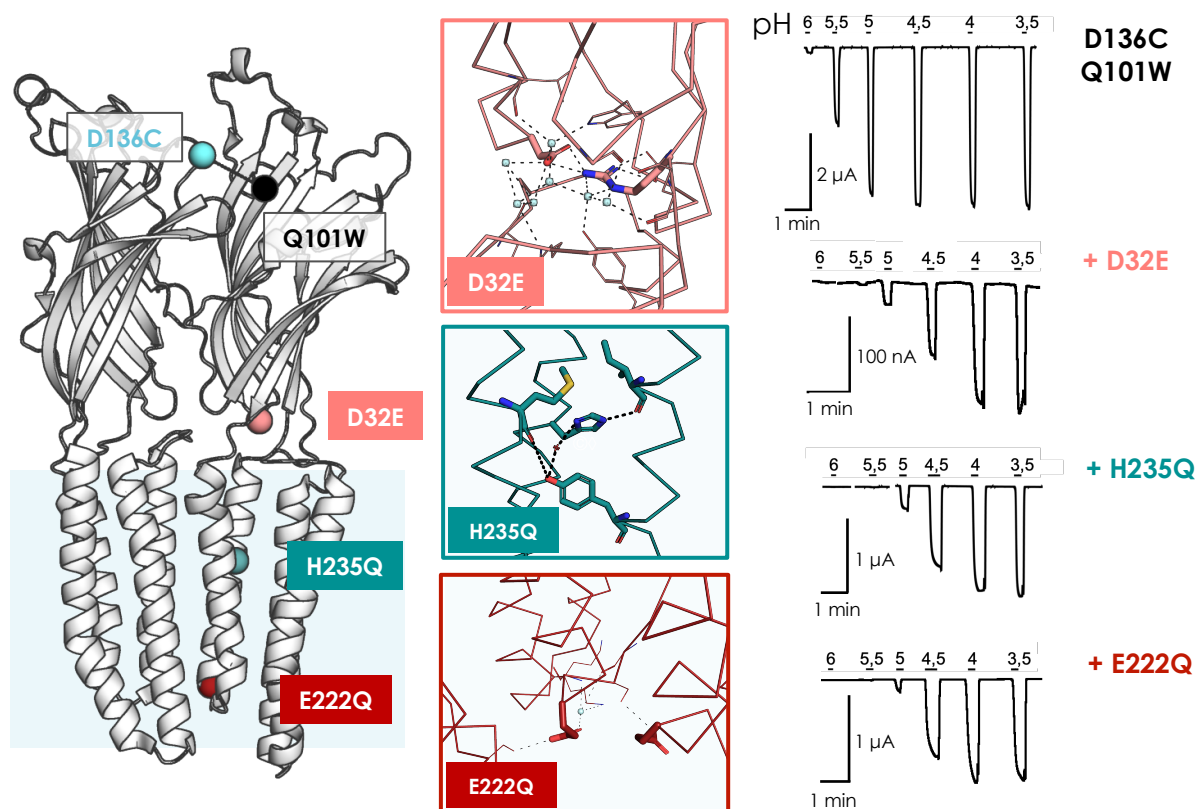


Figure 2. Position et caractérisation des mutations perte de fonction. À gauche, structure de deux monomères de GLIC avec en sphère la paire de quenching utilisée en haut de l'ECD et les trois mutations perte de fonction étudiées. Un zoom sur la structure montre la position du résidu dans la structure à pH 4 avec les principales interactions en pointillés avec les résidus voisins représentés en bâtons ou lignes et les molécules d'eau en sphères. On voit le pont salin D32-R192 en haut ; les interactions de H235 avec I259, Y266 et M205 au milieu et en bas deux E222 de deux sous-unités sont représentés. À droite, exemples de tracés électrophysiologiques représentatifs des courants évoqués par différentes concentrations de protons, illustrant la diminution de sensibilité au proton des mutants.

Effet des mutations D32E H235Q et E222Q sur la fluorescence

Les trois mutants D32E, H235Q et E222Q combinés aux D136C Q101W ont été produits, purifiés en détergent dodécylmaltoside (DDM) et marqués au bimane. La fluorescence a ensuite été mesurée aux différents pH et normalisée sur la fluorescence de l'échantillon à pH 7,4, dénaturé par 20 % de dodecylsulfate de sodium (SDS). Les résultats des trois mutants sont comparés au récepteur D136C Q101W sans mutation additionnelle (construction contrôle de référence). L'amplitude du ΔF entre les valeurs de fluorescence les plus hautes et les plus basses (F_{MAX}) est similaire pour les mutants et la construction contrôle. La valeur de fluorescence à pH 7,4 (F_0) est également similaire pour les différents mutants. En revanche, on voit que pour les trois mutants, la courbe de quenching est décalée vers les plus hautes concentrations en proton (Figure 3).

Les données d'électrophysiologie et de fluorescence ont été ajustées avec l'équation de Hill pour comparer les pH_{50} et les coefficients de Hill (n_H) évaluant la coopérativité (Tableau figure 3). On note une bonne adéquation entre les données de fluorescence et d'électrophysiologie, avec un ΔpH_{50} similaire pour D32E et E222Q ; et un ΔpH_{50} plus important pour H235Q. Concernant le coefficient de Hill, il a tendance à diminuer en électrophysiologie pour H235Q.

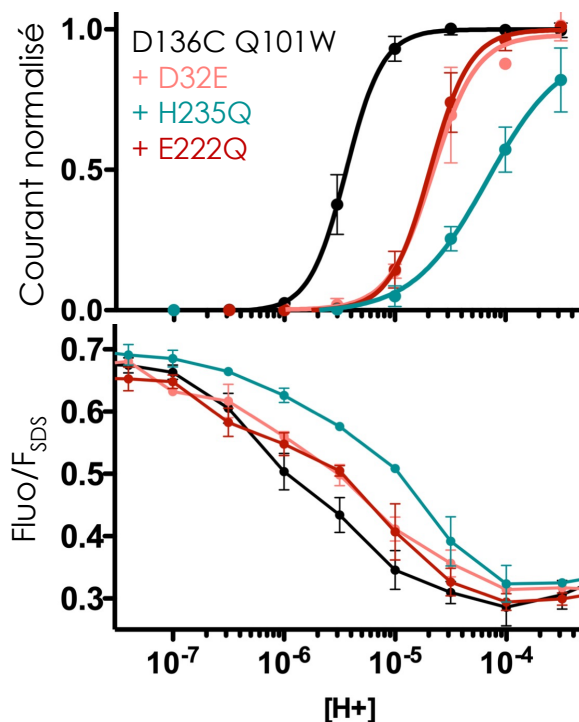


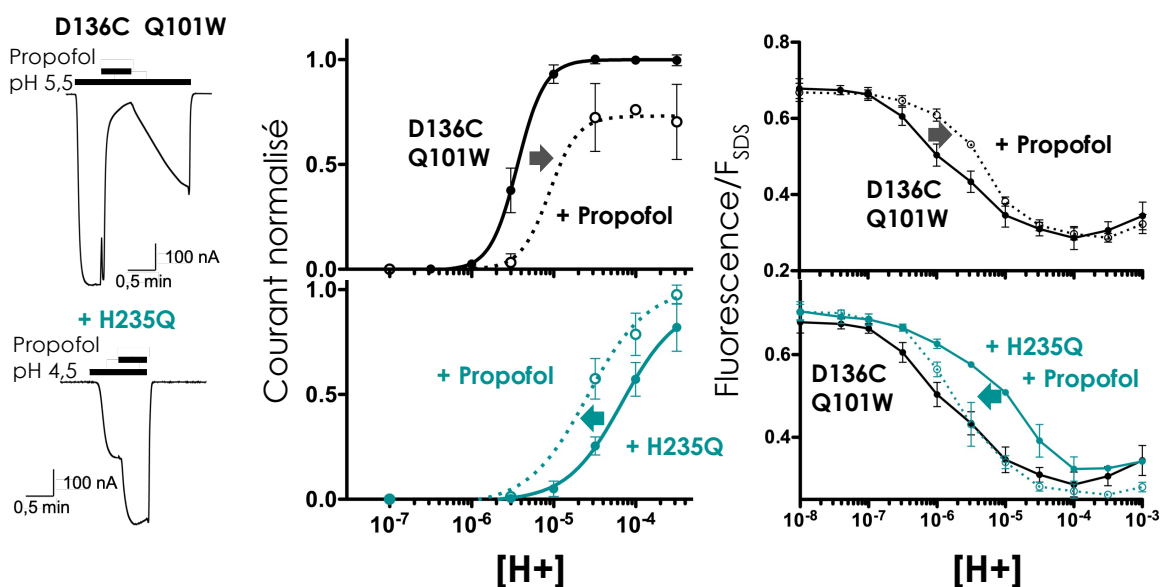
Figure 3. Comparaison de la fonction et de la compaction de l'ECD des mutants perte de fonction. Le premier graphique représente les courbes doses-réponses enregistrées en électrophysiologie des différents mutants marqués au bimane sur la position D136C. Le deuxième graphique représente le quenching mesuré à l'équilibre en fonction du pH sur les mutants de GLIC D136C Q101W en détergent. Le tableau résume les valeurs de pH_{50} et n_H en courant et fluorescence, ainsi que les valeurs de fluorescence initiales et l'amplitude maximale de fluorescence. Le nombre d'échantillon est précisé avec le nombre d'injection pour l'électrophysiologie et le nombre de production/purification pour la fluorescence.

Mutant	Courant				Fluorescence				
	pH50	pH50 (Littérature)	n _H	n (n injections)	pH50	n _H	F _{MAX} (F / F SDS)	F ₀ (F / F SDS)	n (n prod)
D136C Q101W	5,42 +/- 0,08	5,4 +/- 0,2	2,68 +/- 0,33	10 (4)	5,84 +/- 0,21	0,77 +/- 0,18	0,4 +/- 0,02	0,68 +/- 0,02	14 (6)
+ D32E	4,65 +/- 0,12	4,6 +/- 0,1	2,62 +/- 1,51	6 (2)	5,53 +/- 0,05	0,75 +/- 0,05	0,37 +/- 0,003	0,69 +/- 0,01	3 (1)
+ E222Q	4,68 +/- 0,09	4,1 +/- 0,2	2,58 +/- 0,34	6 (2)	5,44 +/- 0,10	0,83 +/- 0,17	0,36 +/- 0,03	0,66 +/- 0,02	3 (1)
+ H235Q	4,08 +/- 0,15	4,1 +/- 0,1	1,19 +/- 0,31	6 (2)	4,6 +/- 0,35	0,6 +/- 0,12	0,4 +/- 0,03	0,71 +/- 0,02	3 (1)

Ces mesures indiquent que les mutations testées ici ont un impact global sur la réorganisation du récepteur en défavorisant la compaction du domaine extracellulaire qui a lieu lors de la pré-activation. Elle n'empêche pas la compaction qui est totale à bas pH (le F_{MAX} est similaire à la construction contrôle). En revanche les courbes dose-réponse sont déplacées vers les plus hautes concentrations comme c'est le cas en électrophysiologie. Ces mutations sont localisées dans des régions distantes du haut de l'ECD où est mesurée la compaction. Il est remarquable d'observer que malgré cette distance, les mutations en bas de l'ECD, au milieu et en bas du TMD perturbent le processus de compaction. Ces données sont en accord avec le modèle MWC qui suggère qu'au cours de la pré-activation un mouvement concerté de l'ensemble de la protéine a lieu de l'extrémité cytoplasmique à l'extrémité extracellulaire. Ces résultats prolongent les observations faites précédemment sur GLIC et montrent que des régions qui ne sont pas accessibles au marquage dans le TMD sont aussi impliquées dans les réorganisations liées à la pré-activation. Les ΔpH_{50} des mutants en comparaison de la construction contrôle sont plus importants en électrophysiologie qu'en fluorescence. Les mutations affectent donc également l'activation, soit en perturbant directement l'étape d'activation, soit de manière indirecte en déplaçant fortement l'équilibre entre l'état au repos et le pré-actif. Des ajustements de ces courbes sont en cours, en utilisant un modèle MWC à trois états pour évaluer ces hypothèses.

Effet bidirectionnel du propofol

Nous avons également étudié l'effet d'un modulateur allostérique, le propofol, qui est un anesthésique général couramment utilisé en clinique. Le propofol est un modulateur allostérique négatif de GLIC, produisant en électrophysiologie et en quenching de fluorescence, un déplacement des courbes dose-réponse vers les plus hautes concentrations en proton (Menny et al., 2017; Nury et al., 2011). Comme cela a été montré dans plusieurs études récentes (Fourati et al., 2018; Heusser et al., 2018; LeBard et al., 2012), l'effet du propofol est complexe avec probablement un site d'inhibition dans le canal et un ou plusieurs sites de potentialisation inter et intra sous-unité dans le haut du TMD. De plus, il a été montré que le mutant H235Q était non pas inhibé mais potentialisé par le propofol. À partir de ces informations, plusieurs observations peuvent être faites sur les données de fluorescence et d'électrophysiologie en présence d'une concentration saturante en propofol de 100 μ M. Pour GLIC 136C Q101W, on mesure un effet inhibiteur sur la fluorescence entre pH 6,5 et pH 5 en accord avec les données publiées (Menny et al., 2017), comme pour les mutations de la partie précédente un effet allostérique sur la compaction de l'ECD est observé (Figure 4). En dessous de pH 5, il n'y a plus d'effet visible sur la fluorescence alors qu'une inhibition a lieu en électrophysiologie. Cela suggère qu'à ces pH, le propofol aurait un effet spécifique sur l'activation, indiquant possiblement un simple effet de bloquant du canal.



Mutant	Courant			Fluorescence				
	pH50	nH	n (n injections)	pH50	nH	F _{MAX} (F/F _{SDS})	F ₀ (F/F _{SDS})	n (n prod)
D136C Q101W	5,42 +/- 0,08	2,68 +/- 0,33	10 (4)	5,84 +/- 0,21	0,77 +/- 0,18	0,4 +/- 0,02	0,68 +/- 0,02	14 (6)
+ Propofol	5,05 +/- 0,72	< 2,5	3 (1)	5,53 +/- 0,06	1,21 +/- 0,21	0,38 +/- 0,01	0,67 +/- 0,02	4 (2)
+ H235Q	4,08 +/- 0,15	1,19 +/- 0,31	6 (2)	4,6 +/- 0,35	0,6 +/- 0,12	0,4 +/- 0,03	0,71 +/- 0,02	3 (1)
+ Propofol	4,59 +/- 0,73	1,20 +/- 0,31	3 (1)	5,66 +/- 0,15	1,21 +/- 0,07	0,45 +/- 0,01	0,71 +/- 0,02	3 (1)

Figure 4. Effet structural et fonctionnel du propofol. Exemple de tracés électrophysiologiques avec application de propofol à 100 μ M à pH 5,5 ou 4,5 sur les mutants sensibles à son effet inhibiteur (D136C Q101W) ou potentialisateur (+ H235Q). Courbes doses réponses en courant et fluorescence pour les mutants sans (trait plein) et avec propofol (pointillés). Le tableau récapitule les valeurs issues des ajustements des données.

Pour le mutant D136C Q101W H235Q, on mesure effectivement par électrophysiologie, une augmentation des courants en présence de 100 μ M de propofol à partir de pH 5 jusqu'à pH 3,5. En fluorescence, on observe également un décalage important de la courbe de fluorescence vers les plus faibles concentrations en protons ce qui est cohérent avec l'effet potentialisateur observé. À partir de pH 5,5 jusqu'à pH 3, la courbe de fluorescence de H235Q + propofol est décalé vers les basses concentrations de protons et elle est proche de celle de D136C Q101W en l'absence de propofol. On peut en déduire que pour ce mutant H235Q, le propofol compense une partie de l'effet perte de fonction, favorisant ainsi la compaction du domaine extracellulaire. Ces mesures sont une bonne illustration des effets allostériques que peuvent avoir des modulateurs sur les réorganisations structurales de GLIC. Ces données documentent les mécanismes allostériques décrits précédemment qui concernent aussi bien les mutations que les modulateurs allostériques.

Même si la pharmacologie de GLIC n'est pas aussi riche que celles des RCPs eucaryotes, quelques modulateurs supplémentaires ont été testés. L'acide caféique a été découvert comme étant un antagoniste de GLIC se liant dans le site orthostérique (Prevost et al., 2013). Une concentration de 100 μ M proche de la concentration saturante, montre comme on pourrait l'attendre pour un antagoniste, un déplacement vers les plus hautes concentrations de proton de la courbe de quenching de la fluorescence. La picrotoxine est connue pour être

un bloquant du canal et pour avoir un effet sur la désensibilisation des RCPs eucaryotes. À l'inverse de l'acide caféique, celle-ci ne perturbe pas la courbe de quenching (Figure 5).

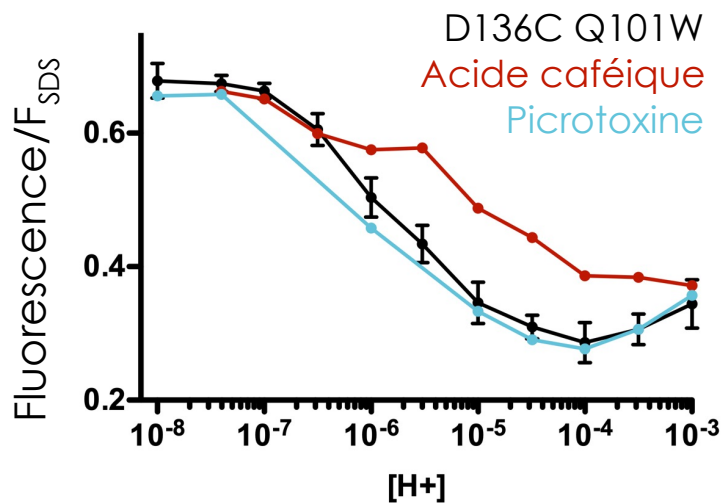


Figure 5. Effet des modulateurs sur la compaction de l'ECD. Fluorescence du bime sur le mutant de GLIC D136C Q101W en fonction du pH, en absence ou présence de 100 μ M d'acide caféique (inhibiteur se liant dans le site orthostérique) et de picrotoxine (Bloquant du canal).

Découplage des mouvements

H235F stabilise un intermédiaire localement fermé

Certaines mutations ont montré un effet encore plus important que les trois mutations pertes de fonction étudiées dans la première partie, notamment la mutation H235F qui produit une perte de fonction totale. L'histidine 235 avait été proposée comme senseur du proton car sa mutation en phénylalanine abolit totalement la fonction de GLIC (H. L. Wang, Cheng, & Sine, 2012). Le fait que le mutant H235Q soit toujours fonctionnel a remis en question cette hypothèse. H235F a été résolu par cristallographie à pH 4 dans une conformation localement fermée et cette conformation pourrait ressembler à un état intermédiaire transitoirement peuplé au cours de l'activation (Prevost et al., 2012). L'ajout des mutations cystéine et tryptophane ne change pas ce phénotype et des expériences d'immunofluorescence sur ovocyte indiquent que le récepteur non fonctionnel s'exprime de façon robuste à la membrane des ovocytes (Figure 6).

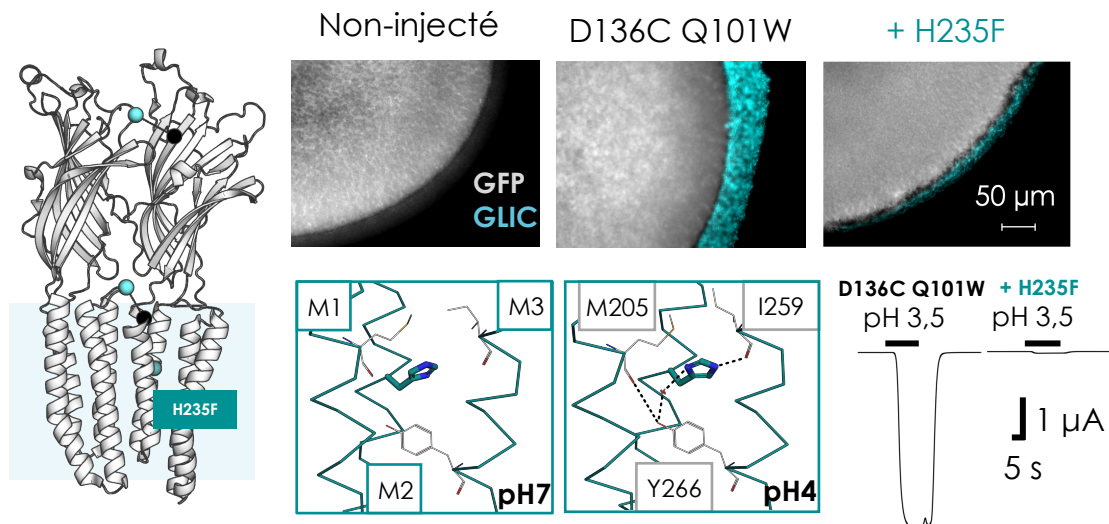


Figure 6. H235F provoque une perte totale de fonction. À gauche, position de la mutation sur la structure de GLIC avec les deux positions des senseurs fluorescents utilisés. En bas, zoom sur l'orientation du résidu H235 dans les structures à pH 7 et 4 avec en gris les résidus interagissant avec H235 dans l'état actif. En haut, immunofluorescence sur ovocytes montrant l'expression à la membrane des mutants D136C Q101W avec et sans la mutation H235F. Les ovocytes sont co-injectés avec un plasmide contenant le gène codant pour la GFP, qui est le seul signal visible dans le contrôle négatif injecté uniquement avec l'ADN codant la GFP. Les tracés en électrophysiologie montrent une absence de courant aux pH les plus acides pour le mutant H235F.

Pour mieux comprendre la distinction entre les mutations partielles explorées juste avant, et la perte de fonction totale du mutant H235F, la fluorescence a été regardée à la fois en D136C et en P250C. Ces mesures donnent un phénotype particulier qui contraste avec celui des mutations partielles. En D136C Q101W, l'amplitude du changement de fluorescence diminue légèrement avec la mutation, et on voit un déplacement de la courbe dose réponse vers les plus hautes concentrations (Figure 7). En P250C Y197, les effets sont plus importants. On observe comme en D136C Q101W un déplacement de la courbe de quenching vers les plus hautes concentrations avec un décalage de ΔpH_{50} similaire pour les deux positions. En plus de ce déplacement la courbe de dé-quenching mesurée en P250C a une amplitude beaucoup plus faible que la concentration contrôle, environ divisée par deux. À bas pH, ce mutant est donc stabilisé dans une conformation pour laquelle l'ECD est compacté, où le canal est fermé et où une réorganisation partielle de la paire P250C -Y197 a lieu. Avec ces deux senseurs de la conformation, les résultats de fluorescence indiquent que le récepteur est bloqué dans un état différent de l'état pré-actif.

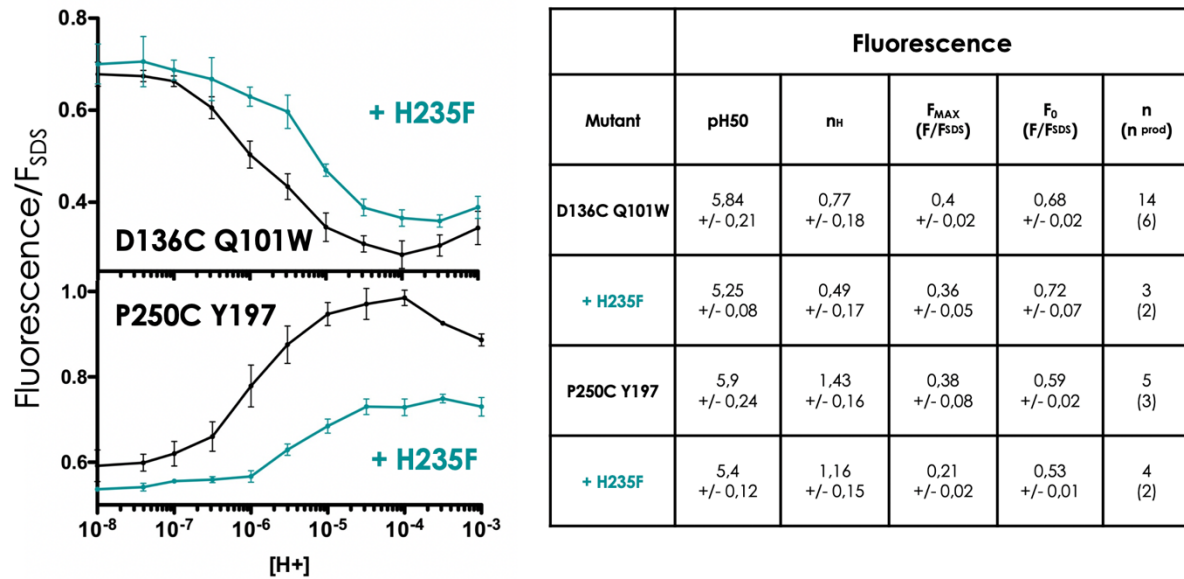
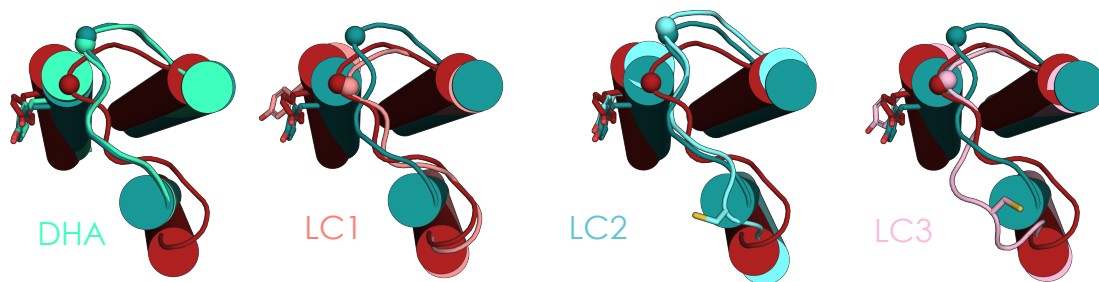


Figure 7. Effet de la mutation H235F sur la fluorescence. Intensité de fluorescence en fonction du pH pour la compaction de l'ECD et le mouvement de la boucle M2M3 en absence et présence de la mutation H235F.

Plusieurs structures localement fermées (LC) avec l'ECD dans la conformation active et le canal fermé ont été résolues et peuvent correspondre aux observations en fluorescence du mutant H235F. Ces différentes structures LC diffèrent par la position de la boucle M2M3, l'inclinaison du haut de M2 (*tilt*) mais aussi par l'orientation de la tyrosine 197 (Figure 8). La forme LC1 a été obtenue par la cristallisation du mutant de GLIC H235F, et les structures LC2 et LC3 viennent de contraintes artificielles créées par des ponts disulfures entre la boucle M2M3 et la boucle 2 (Prevost et al., 2012). Une autre structure cristallisée en présence de DHA peut aussi être considérée comme une structure LC (Basak et al., 2017).

Dans la structure du LC1, une différence remarquable est l'orientation de la chaîne latérale de la tyrosine 197. Dans les structures de GLIC sauvage à pH 7 et pH 4, elle est orientée vers l'ECD et interagit avec les boucles M2M3 et Cys-loop. En revanche dans la structure LC, elle fait face au TMD et interagit via une liaison hydrogène avec la thréonine 255 qui se trouve sur le haut de l'hélice M3. Dans cette conformation on observe une augmentation de la distance entre le quencher et la position P250 sans qu'il y ait de mouvement de la boucle M2M3. Les observations en fluorescence du mutant H235F et l'analyse structurale convergent vers une conformation LC de ce mutant à bas pH avec la boucle M2M3 dans la même configuration que l'état de repos. La réorganisation locale de la tyrosine expliquerait le dé-quenching partiel observé en fluorescence.



Structure	pH4 Actif	pH 7 Repos	DHA Pré-actif	LC1 H235F	LC2 2-21'	LC3 2-22'
code PDB	4HFI	4NPQ	5J0Z	3TLT	3TLW	3TLV
Distance (Å) 250 Ca – 197 Cy	9,57 +/- 0,13	7,43 +/- 0,16	9,26 +/- 0,05	9,22 +/- 0,58	10,16 +/- 0,05	8,14 +/- 1,06
Boucle M2M3	Extérieur	Intérieur	Extérieur	Intérieur	Extérieur	Intérieur
Orientation Y197	5 Haut	5 Haut	5 Haut	1 Haut 5 Bas	5 Haut	3 Haut 2 Bas
Tilt de M2	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non
Distance Ca 101-136	11,52 +/- 0,12	14,77 +/- 0,70	11,28 +/- 0,11	11,7 +/- 0,07	11,64 +/- 0,19	11,7 +/- 0,31

Figure 8. Position de la boucle M2M3 dans les conformations LC. Superpositions des structures de GLIC à pH 7 et 4 avec les différentes structures LC. Les boucles M2M3 et les hélices M2 et M3 d'une sous unité sont représentées avec l'hélice M1 de la sous-unité adjacente. Le Ca de P250 est représenté en sphère et la tyrosine 197 ainsi que la cystéine formant le pont disulfure du LC3 sont représentés en bâtons. Le tableau résume les caractéristiques de chaque structure.

La structure en présence de DHA pourrait également rendre compte des données de fluorescence du H235F. Dans cette structure, l'hélice M2 est inclinée, et la boucle M2M3 est dans la conformation active avec la chaîne latérale de Y197 pointant vers le haut. Les mesures de distance 250Ca – 197Cy donnent une distance plus faible que dans l'état actif, ce qui pourrait expliquer l'amplitude plus faible du H235F avec le bimane en position P250C. Pour évaluer cette idée, on peut regarder la fluorescence en présence de DHA en P250C et en D136C. Les mesures indiquent que dans la gamme de pHs utilisée, la fluorescence en D136C et en P250C est similaire, voire identique, avec et sans DHA. Cela montre que le DHA produit un effet structural plus subtil, et que cette structure ne correspond probablement pas aux réorganisations du H235F. Néanmoins, la structure en DHA est un bon candidat pour représenter l'état pré-actif, avec la boucle M2M3 dans la même position que l'état actif, l'ECD compacté, et le canal fermé (Figure 9). Pour appuyer cette idée, l'hypothèse à récemment été émise que le DHA ne stabilisait pas un état désensibilisé comme cela été proposé dans l'article

original, mais plutôt un état intermédiaire de l'activation (Gielen & Corringer, 2018). De plus on observe en D136C un léger décalage de la courbe de fluorescence vers les plus faibles concentrations en proton en présence de DHA. Cet effet gain de fonction est attendu dans le cas d'une stabilisation de l'état pré-actif.

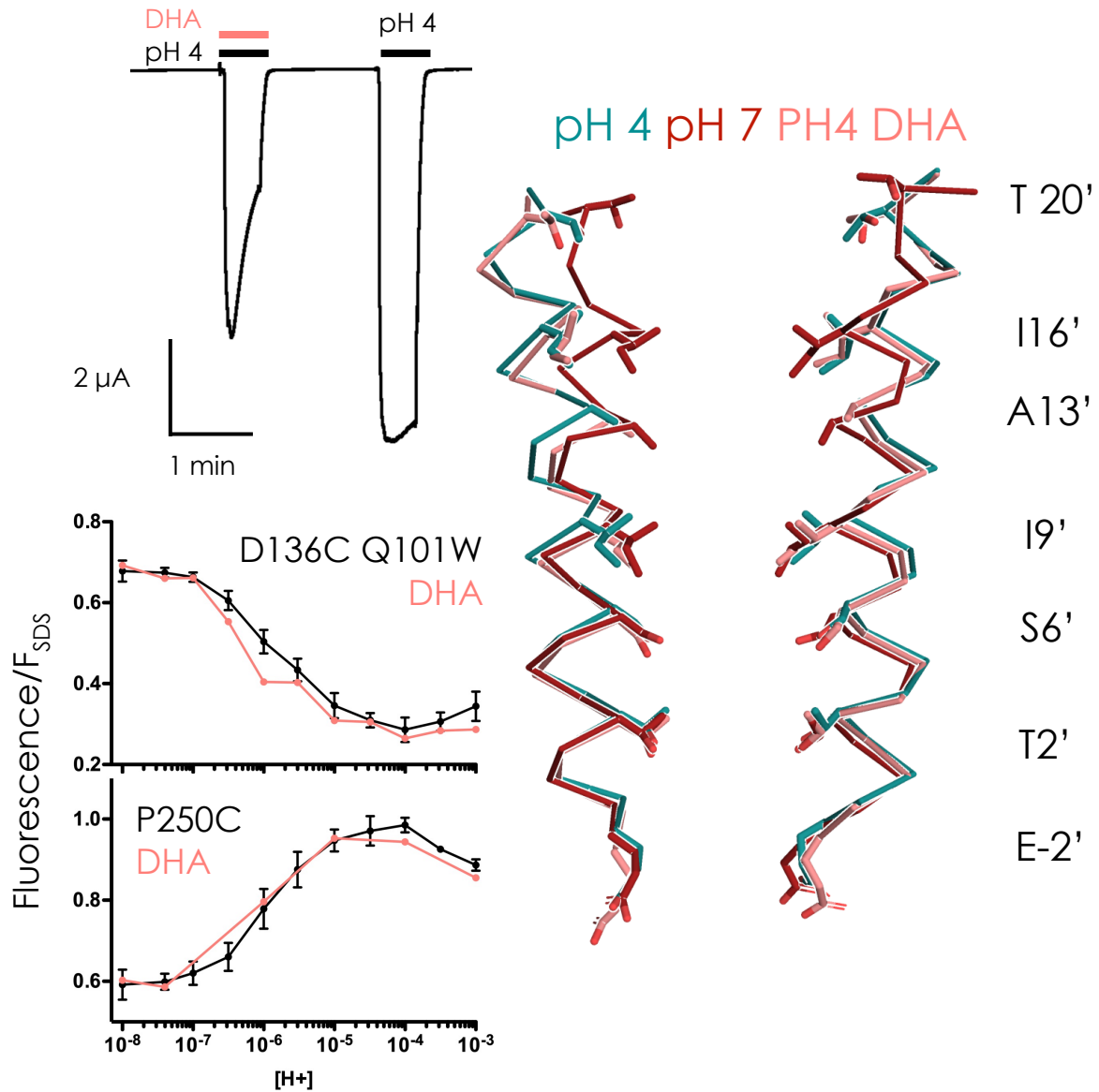


Figure 9. Effet du DHA sur GLIC. Exemple de tracé électrophysiologique de GLIC D136C Q101W montrant une perte de courant lors d'une application à pH 4 de DHA à 100 μM. La fluorescence en fonction du pH est similaire en absence et présence de DHA pour les deux positions D136C Q101W et P250C. À droite, la structure du canal de GLIC en présence de DHA superposée aux structures à pH 4 et pH 7 indique que le tilt de M2 a eu lieu mais le point de constriction en 9' est toujours présent (deux M2 de sous-unités non adjacentes sont représentées et en bâtons les chaînes latérales des résidus formant le canal).

En conclusion, les données sont cohérentes avec l'idée que : 1) la structure en présence de DHA est un bon modèle de l'état pré-actif décrit par les données de quenching 2) le quenching mesuré en P250C pour le mutant H235F correspond à sa transition vers l'état LC1, montrant une excellente cohérence entre les données de fluorescence et de cristallographie. Ces données suggèrent donc un effet de découplage du H235F qui autorise la compaction complète de l'ECD, mais ne permet pas l'ouverture du canal avec la boucle de couplage M2M3 dans la même position que dans l'état de repos.

L246A et L157A présentent des conformations intermédiaires inédites

Deux autres mutations L157A et L246A produisent également un récepteur non fonctionnel et ont été prédites par la comparaison des structures de GLIC à pH 7 et pH 4 (Sauguet et al., 2014). Ces deux leucines sont conservées chez les RCPs et ont une orientation et des interactions hydrophobes différentes selon l'état ouvert ou fermé (Figure 10).

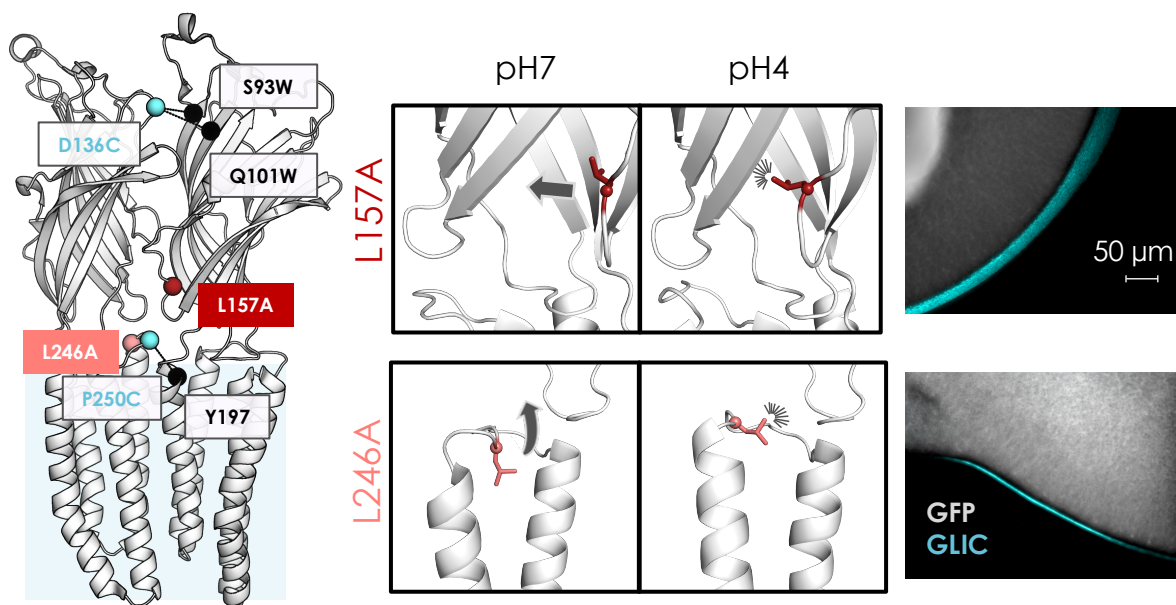


Figure 10. L157A et L246A entraînent une perte de fonction totale. Position des deux leucines sur la structure de GLIC pH 4 avec les deux senseurs de la compaction de l'ECD et du mouvement de la boucle M2M3. Dans l'état actif, la leucine 157 interagit avec le sandwich β et L246 avec des résidus aromatiques la Cys-loop. Les deux mutants s'expriment à la membrane des ovocytes.

La leucine 157 se trouve sur la boucle F et fait face à l'intérieur du sandwich β . À pH 4 elle contribue à la stabilisation de la conformation compact du sandwich β via des interactions hydrophobes. La leucine 246 est sur la boucle M2M3, à pH 7 elle est orientée dans un environnement hydrophobe dans le haut du TMD. Le mouvement de la boucle à pH 4 l'oriente

vers l'ECD où elle effectue des interactions hydrophobes avec F116 et Y119 de la Cys-loop. De même que pour le mutant H235F, les mutants L157A et L246A ont été ajoutés aux mutants Cys(Trp) de l'ECD et de la boucle M2M3 et l'expression de récepteurs non fonctionnels a été vérifiée par électrophysiologie et immunofluorescence.

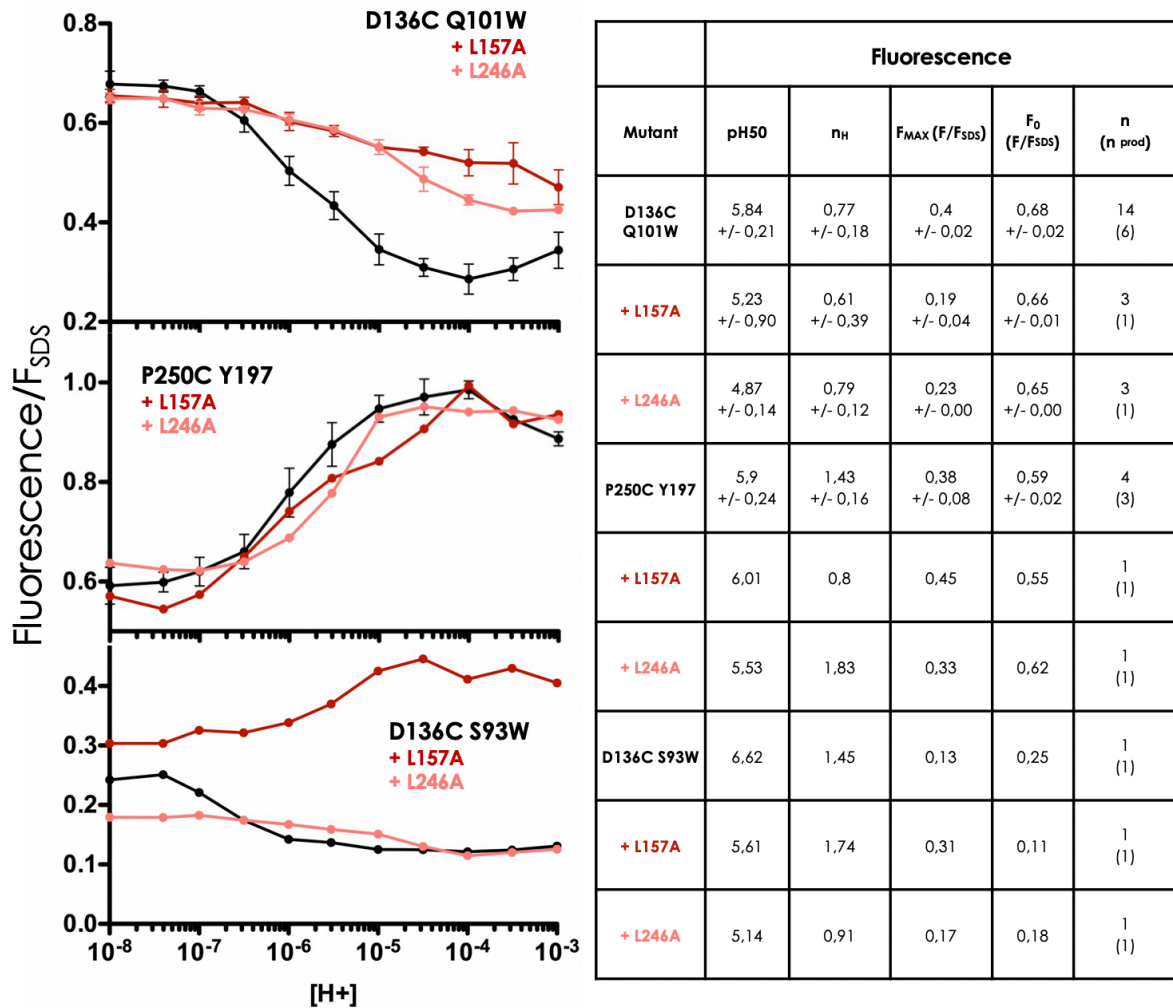


Figure 11. Effet de la mutation des leucines sur les ré-organisations de GLIC. Fluorescence en fonction du pH des mutants leucine pour les différents rapporteurs de changement de conformation. Le tableau récapitule les valeurs issues des ajustements.

En D136C Q101W, la mutation des leucines produit une amplitude de quenching F_{MAX} de nettement plus faible amplitude que celles du mutant H235F et de la construction contrôle. Cette différence d'amplitude est associée à un décalage du pH_{50} vers les plus hautes concentrations (Figure11). Cela suggère un mouvement de compaction partiel qui peut être dû soit à une distance intermédiaire entre le fluorophore et le quencher soit, à une asymétrie pour laquelle seulement une fraction de interfaces a effectué le mouvement. En ce qui

concerne la boucle M2M3, l'amplitude de quenching est similaire avec et sans mutation et le pH_{50} est légèrement décalé vers les plus bas pH. Ces deux mutations présentent donc un phénotype inverse au mutant H235F : à bas pH leurs boucles M2M3 ont effectué l'intégralité du mouvement vers l'extérieur mais l'ECD n'est que partiellement compacté.

Les données de fluorescence pour ces mutants semblent donc indiquer une compaction partielle de l'ECD. On ne peut cependant pas exclure qu'une réorganisation locale au niveau de la sonde fluorescente éloigne les positions 136 et 101 et modifie la mesure de la compaction de l'ECD. Pour évaluer cette possibilité, il est possible de regarder le mouvement du bimanche en D136C avec un autre tryptophane. Lors de la mise au point des paires de quenching, une position du tryptophane S93W sur le brin $\beta 5$ avait été étudiée. Elle montre une fluorescence faible à pH 7,4 avec une diminution de faible amplitude. Cette paire de quenching n'est pas efficace pour rapporter la compaction de l'ECD car la proximité des deux positions est trop importante et le quenching est déjà proche de son maximum dans l'état de repos.

Si la distance 136-101 est altérée par la mutation des leucines, on doit pouvoir l'observer avec la paire 136-93 (Figure 11). En ce qui concerne la leucine 246, on observe une légère diminution de l'intensité de fluorescence à pH 7,4, suivi d'un quenching de faible amplitude similaire à celui de la construction contrôle, avec un décalage du ΔpH_{50} vers les concentrations en proton les plus fortes. On peut conclure pour ce mutant que la compaction de l'ECD est bien partielle, et il est possible d'observer le début de cette compaction avec le quenching total observé en 136-93 et le quenching partiel en 136-101.

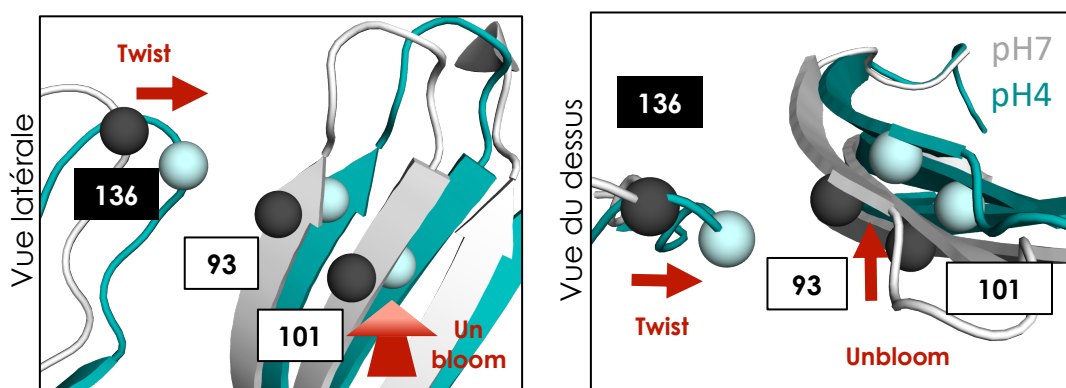


Figure 12. Décomposition de la compaction de l'ECD. Décomposition des mouvements de unblooming et de twist qui résultent en la compaction de l'ECD entre les structures à pH 7 et 4. L'altération d'un de ces mouvements pourrait expliquer un changement de distance contraire entre 136-93 et 136-101.

Les résultats en 136-93 sont plus inattendus pour la leucine 157. En effet on observe pour ce mutant une légère augmentation de la fluorescence basale à pH 7, suivi d'une augmentation pH dépendante robuste, indiquant un éloignement des deux positions. Ces données suggèrent donc une transition vers une conformation de GLIC pour lequel la boucle M2M3 bouge, et la position 136 se rapproche légèrement de la position 101 tout en s'éloignant de la position 93. Pour expliquer ces résultats apparemment contradictoires, on peut décomposer la compaction de l'ECD en deux mouvements principaux (cf. introduction) : le *unblooming* qui translate les sous-unités vers l'axe central de symétrie au milieu du vestibule, et une torsion ou *twist* qui correspond à une translation des sous-unités les unes par rapport aux autres dans le sens antihoraire (Figure 12). En conservant la composante de *unblooming* mais pas celle de *twist*, on pourrait expliquer les observations faites sur le mutant L157A avec Q101W qui se rapproche de D136C et S93W qui s'en éloigne. Toutefois, les analyses électrophysiologiques de GLIC D136C marqué au bimane montrent qu'en présence du tryptophane S93W une perte de sensibilité au proton d'un ordre de grandeur est produite alors que le tryptophane Q101W donne une fonction similaire au récepteur sauvage. On voit dans les structures que la position du tryptophane en S93W est d'avantage enfouie dans l'interface entre sous-unités en comparaison avec la position Q101W. Ces données indiquent que la mutation S93W perturbe les réorganisations de GLIC et les données relatives à ce mutant sont à prendre avec précautions.

En conclusion, les deux mutations L246A et L157A montrent de manière similaire à la mutation H235F un découpage des réorganisations de l'ECD et de la boucle M2M3. À l'inverse de la mutation H235F, aucune structure publiée de GLIC ne reproduit les mouvements mesurés en fluorescence car seule la structure de l'état de repos à pH 7 présente un ECD non compacté avec la boucle M2M3 orientée vers l'intérieur. Pour caractériser plus en détail la conformation de l'ECD dans ces mutants, une possibilité serait de tester d'autres positions de bimane-quencher pour collecter d'autres données de distance

En plus de leur effet local anticipé par les structures, ces mutations changent donc en profondeur les équilibres allostériques et empêchent la réorganisation complète de l'ECD (157/246) ou du TMD (235), résultant en un récepteur non fonctionnel. On assiste à un découplage des mouvements de la boucle M2M3 et de l'ECD.

Région clé pour la distance inter sous-unité et la stabilité de l'état de repos

Des mutations impactant la fonction ont été testées dans une dernière région de GLIC qui est à l'interface entre sous-unités en dessous de la poche orthostérique. Deux mutations identifiées dans la recherche du senseur des protons montrent une perte de fonction partielle pour le mutant E26Q et un léger gain de fonction pour la mutation Y28F. Sur le fond de mutation C27S D136C Q101W, l'effet perte de fonction est conservé pour le mutant E26Q (Figure 13). En revanche au lieu de montrer un gain de fonction, la mutation Y28F sur ce même fond de mutation provoque une perte de fonction très importante. Le courant est visible à partir de pH 4,5 avec une phase d'activation très lente pour arriver au plateau. Comme des courants endogènes peuvent être présents dans les ovocytes aux pH très acides, une application de picrotoxine, bloquant spécifique des RCPs permet de montrer que ces courants proviennent bien de GLIC.

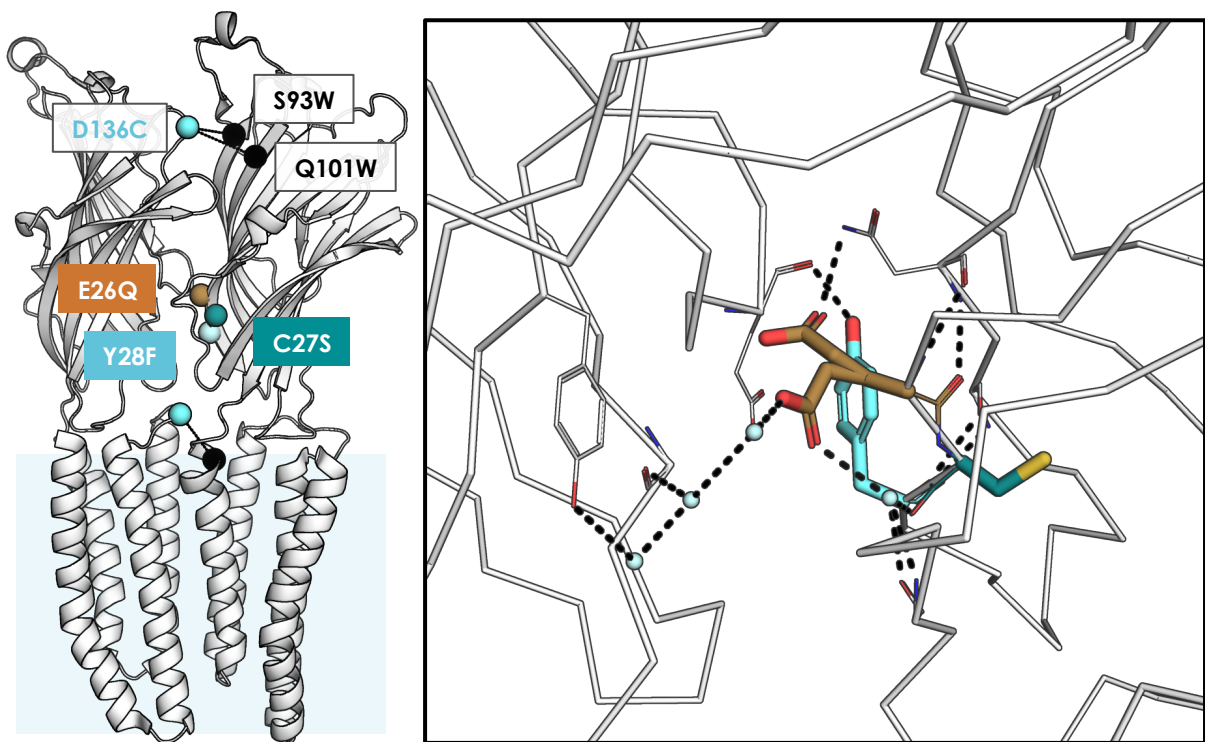
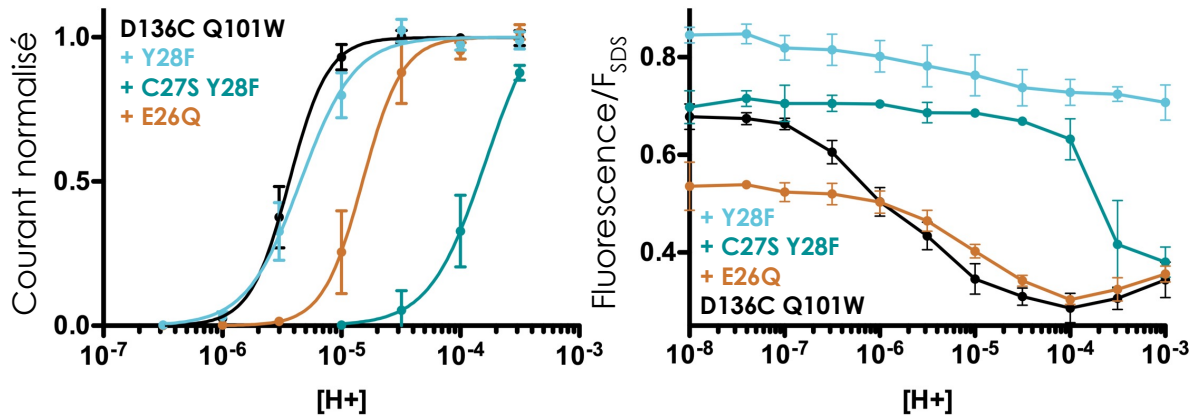


Figure 13. Position des mutations affectant la conformation de l'état de repos. À gauche, positions des mutations sur la structure de GLIC à pH 4 avec les 3 senseurs de la conformation. À droite, zoom sur le bas de l'ECD où les interactions de E26 et Y28 avec la sous-unité adjacente sont représentées. E26 présente deux rotamères de sa chaîne latérale et interagit via un réseau de molécules d'eau avec la sous-unité voisine.

En conservant la cystéine endogène C27, on trouve un courant proche du sauvage pour le récepteur Y28F D136C Q101W mais il ne présente pas un gain de fonction. Cette cystéine endogène avait été mutée par précaution pour éviter d'observer un marquage non spécifique mais étant orientée vers l'intérieur du sandwich β , elle n'est probablement pas accessible au marquage par le bimane. E26 et Y28 sont orientés vers la sous-unité adjacente et interagissent avec différents résidus. L'interaction entre l'hydroxyle de Y28 et le carbonyle de E82 est conservée à pH 4 et pH 7,4. À pH 4, E26 est présente sous forme de deux rotamères, et interagit soit avec l'amine de N40 (brin beta) sur la même interface, soit à travers un réseau de molécules d'eau avec l'hydroxyle de Y129 (Cys-loop) et les carbonyles de L111 (Cys-loop) et F156 (boucle F). Il est difficile de savoir si ces interactions sont conservées à pH 7 étant donné la faible résolution (4,5 Å), mais le glutamate adopte un rotamère dirigé vers les boucles F et Cys-loop. Le mutant E26Q a été cristallisé et présente une orientation similaire avec la chaîne latérale orientée vers l'extérieur du récepteur (Nemecz et al., 2017). La conformation à ce niveau de l'interface en bas de l'ECD est relativement conservée entre pH 7 et pH 4, et il n'y a pas de changement notable de réorganisation des autres résidus impliqués.

Les trois mutants ont été étudiés en fluorescence avec la paire 136-101 qui suit la compaction de l'ECD (Figure 14). La courbe de fluorescence du mutant E26Q est décalée vers les plus hautes concentrations en proton. En plus de ce ΔpH_{50} , la fluorescence de l'état de repos est plus faible en présence de la mutation. La fluorescence à pH 4 est la même avec et sans mutation et par conséquent l'amplitude de quenching de E26Q est plus faible. Ces données indiquent que la compaction de l'ECD est déjà partielle dans l'état de repos et quelle continue avec l'augmentation de la concentration en proton.

Au contraire, la mutation Y28F donne une intensité de fluorescence de l'état de repos très supérieure à celle de D136C Q101W. Plus étonnant encore, l'acidification provoque un quenching très faible, une observation apparemment paradoxale pour ce mutant qui est fonctionnel. Les données suggèrent donc que la mutation écarte les sous-unités les unes des autres, même à pH7. On peut alors spéculer que, même s'il y a un rapprochement entre les positions 136 et 101, le bimane reste hors de la sphère de quenching du tryptophane 101. Pour évaluer cette hypothèse, il faudrait tester un quencher plus proche, tel que le S93W. Malheureusement, le mutant Y28F S93W D136C s'exprime mal en bactéries et s'agrège pendant la purification, il n'a pas pu être purifié pour répondre à cette question.



Mutant	Courant			Fluorescence				
	pH50	nH	n (n injections)	pH50	nH	F _{MAX} (F/F _{SDS})	F ₀ (F/F _{SDS})	n (n prod)
D136C Q101W	5,42 +/- 0,08	2,68 +/- 0,33	10 (4)	5,84 +/- 0,21	0,77 +/- 0,18	0,4 +/- 0,02	0,68 +/- 0,02	14 (6)
+ Y28F	5,34 +/- 0,11	2,03 +/- 0,12	6(2)	5,48 +/- 0,77	0,49 +/- 0,17	0,15 +/- 0,02	0,85 +/- 0,01	3 (1)
+ C27S Y28F	3,88 +/- 0,08	2,36 +/- 0,68	3 (1)	3,7 +/- 0,35	> 3	0,37 +/- 0,01	0,73 +/- 0,01	3 (1)
+ E26Q	4,83 +/- 0,12	2,98 +/- 0,64	6 (2)	5,19 +/- 0,37	0,96 +/- 0,24	0,24 +/- 0,02	0,55 +/- 0,02	4 (1)

Figure 14. Effet des mutations du bas de l'ECD. Courbes dose-réponse montrant l'effet fonctionnel des mutations et résultats des mesures de fluorescence en fonction du pH pour GLIC D136C Q101W. Tableau résumant les valeurs venant des ajustements.

Le mutant C27S Y28F donne également un courbe de quenching qui est particulière. L'intensité de fluorescence est comparable avec le D136C Q101W au repos et à pH 3. Entre pH 7 et pH 5 il n'y a pas de changement notable de l'intensité de fluorescence, ce qui est cohérent avec l'absence de courant observée en électrophysiologie. Le courant apparaît à partir de pH 4,5, et l'intensité de fluorescence diminue brusquement à partir de pH 4, pour atteindre le minimum de fluorescence à pH 3.

En conclusion, la double mutation C27S Y28F a un effet très important sur la sensibilité au pH et sur la coopérativité du mouvement de compaction de l'ECD. L'amplitude de quenching est accomplie dans une gamme de pH très restreinte, environ 0.5 unité de pH alors qu'elle s'effectue sur 3 unités de pH dans la plupart des mutants testés. La double mutation C27S Y28F a également été testée avec le bimec en position P250C (Figure 15). À cette

position en électrophysiologie on voit également une courbe dose réponse en courant fortement déplacée vers les hautes concentrations sans atteindre le maximum de courant à pH 3,5. En fluorescence on voit également une courbe de dé-quenching fortement déplacée vers la droite. Cette courbe de dé-quenching est apparemment partielle et l'amplitude maximale n'est pas non plus atteinte à pH 3,5. Ces données sont en bonne adéquation entre les courbes d'électrophysiologie et de fluorescence, avec une grande coopérativité au niveau de la compaction de l'ECD. Il semble donc que seule la compaction de l'ECD soit réalisée de manière abrupte et le mouvement de la boucle M2M3 est plus progressif.

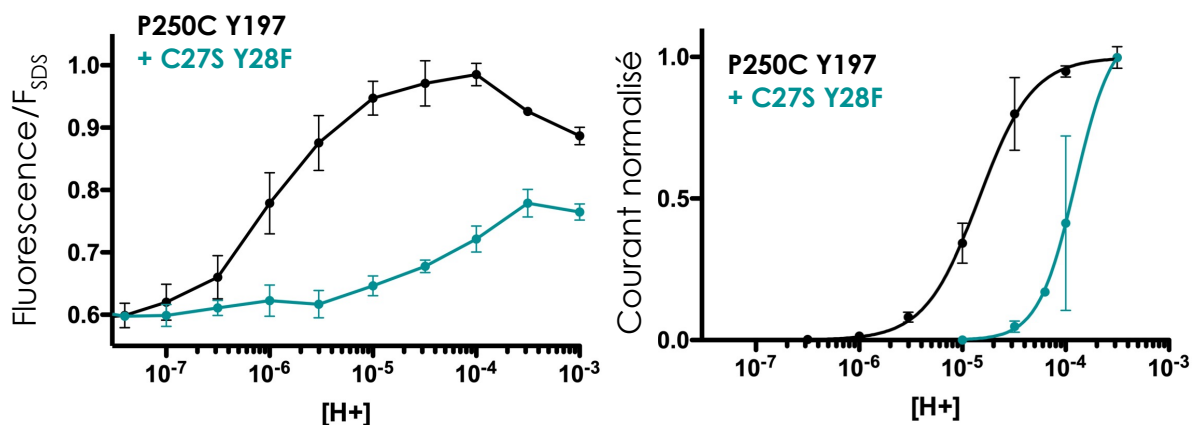


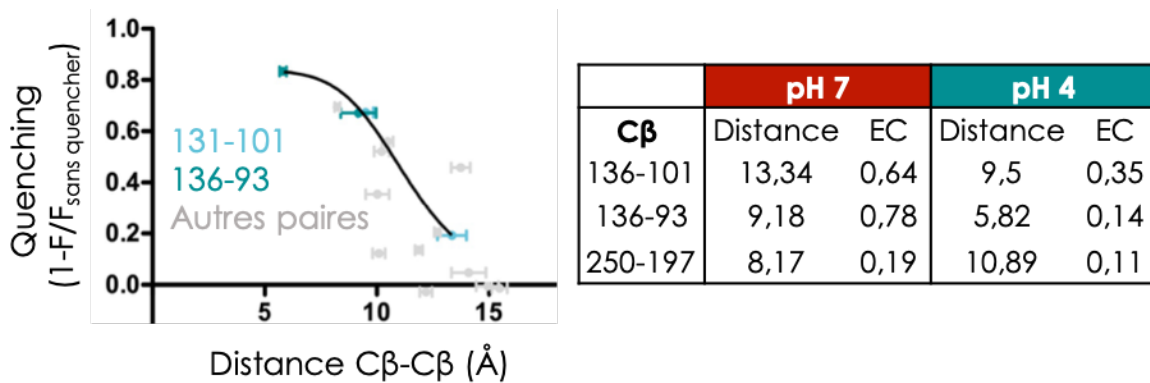
Figure 15. Effet de la double mutation C27S Y28F en P250C.

De façon remarquable, les mutations Y28F et E26Q ont un impact sur la distance inter sous-unités dans l'état de repos. Dans les structures, cette région à l'interface entre sous-unités dans le bas de l'ECD adopte une conformation qui est stable entre les différents états. Une faible perturbation des interactions de cette région semble avoir une répercussion beaucoup plus importante sur le haut de l'ECD. Cet effet de levier est d'ailleurs visible pour le récepteur sauvage lorsqu'on compare les structures pH 4 et pH 7. En effet, comme cela a été vu dans l'introduction, les réorganisations de GLIC en bas de l'ECD sont de faible amplitude alors qu'elles sont beaucoup plus importantes sur la moitié haute. De manière générale, il est intéressant d'observer qu'en plus d'avoir un effet sur les transitions, certaines mutations impactent l'état au repos.

Tentative de détermination de distances pour comparaison avec les simulations

Dans l'état de repos à pH 7, la variabilité de la structure des 4 pentamères de GLIC en cristallographie, ainsi que l'aspect « flouté » des images d'AFM, suggèrent un état beaucoup plus flexible par rapport à l'état ouvert à pH 4 où la structure est mieux définie. On peut alors considérer l'état de repos comme une famille de conformations formant un paysage conformationnel, qui est modifié en présence de mutation. Il est alors possible que les conformations stabilisées par les mutations du bas de l'ECD soient brièvement visitées par le récepteur sauvage.

Pour interpréter de façon plus quantitative les données de fluorescence, c'est à dire convertir les ΔF en Δ distance en angström, j'ai analysé les structures existantes même si leur disponibilité est très limitée pour l'état de repos. En théorie, l'amplitude du quenching de la fluorescence dépend de la distance entre le fluorophore et le quencher de manière exponentielle et le quenching est efficace seulement lorsque les nuages électroniques des deux molécules sont en contact ($<2 \text{ \AA}$). Une évaluation plus précise de l'efficacité de quenching nécessiterait de mesurer le temps de vie de fluorescence du bimanane, mais ces mesures n'ont pas été faites dans ce travail. Cependant, en combinant les valeurs de fluorescence des mutants avec les distances mesurées dans les structures à pH 4 et 7 j'ai tenté de faire une estimation des distances et de les corrélérer aux intensités de fluorescence (normalisée sur la fluorescence sans quencher). Pour avoir une meilleure estimation de l'orientation des chaînes latérales, les mesures de distance ont été faites entre les carbones β du couple fluorophore/quencher (Figure 16).



pH 7,4	L246A		C27S Y28F		Y28F		E26Q	
Cβ	Distance	EC	Distance	EC	Distance	EC	Distance	EC
136-101	13,34	0,64	13,34	0,64	>15	-	11,82	-
136-93	7,84	-	10,66	-	-	-	-	-
250-197	8,17	0,19	8,17	-	-	-	-	-
pH 4	L246A		C27S Y28F		Y28F		L157A	
Cβ	Distance	EC	Distance	EC	Distance	EC	Distance	EC
136-101	10,79	-	12,45	-	13,64	-	11,42	-
136-93	5,82	0,14	5,82	0,14	-	-	10,51	-
250-197	10,89	0,11	9,13	-	-	-	10,89	0,11

Figure 16. Estimation des distances en fonction du quenching. En haut à gauche, efficacité du quenching en fonction de la distance Cβ -Cβ mesurée sur les structures cristallographiques pour les paires Cys-Trp sans mutation allostérique (moyenne et écart-type reportées dans le tableau). L'efficacité de quenching est calculée à partir de la fluorescence, normalisée sur le pH 7 du mutant cystéine sans quencher. En bas, tableau des estimations de distances pour les mutants altérant la fonction à partir des valeurs de fluorescence obtenues et de l'équation résultant de l'ajustement (cf. matériels et méthode pour l'équation utilisée). Les chiffres en couleur indiquent une altération de la distance par les mutations.

Nous sommes en collaboration avec Marc Baaden et Samuel Murail (de l'Institut de Biologie Physico-Chimique), qui ont réalisés une série de simulation par dynamique moléculaire tout-atome de GLIC et de son mutant H235F. Ces jeux de distances seront utilisés pour évaluer si les conformations adoptées par les mutants sont visitées par le récepteur lors des simulations. Ces distances permettront peut-être de rationaliser l'analyse des simulations par modélisation moléculaire et pourraient conforter la validité des observations faites par les deux approches.

Comparaison avec des mutations pathologiques des RCPs humains

Les différentes mutations qui ont été étudiées dans ce travail ont été sélectionnées car leur effet avait été caractérisé auparavant dans diverses études sur GLIC. Elles sont situées

dans des régions particulières de la protéine, aux interfaces entre sous-unité et/ou domaines et les résidus mutés sont souvent impliqués dans des interactions importantes pour la stabilisation de l'état actif. Étant donné la grande conservation structurale entre les RCPs j'ai cherché dans la littérature des mutations pathologiques répertoriées sur les différents RCPs humains à des positions homologues à celles étudiées dans ce travail. Les mutations connues sur les GlyR $\alpha 1$ et β causent un syndrome hyperekplexique (Bode & Lynch, 2014) ; sur les GABA_AR $\alpha 1$ et $\beta 3$ elles provoquent des épilepsies (Hernandez & Macdonald, 2019b) et sur sous-unités des nAChR musculaires $\alpha 1$, β , δ et ϵ elles induisent des myasthénies congénitales (Shen et al., 2008).

Par alignement des séquences et des structures disponibles on trouve effectivement certaines mutations pathologiques analogues à celles étudiées sur GLIC. Deux d'entre elles se trouvent en bas de l'ECD. Une mutation *de novo* du GABA_AR $\alpha 1$ S76R qui est responsable d'un syndrome de Dravet et d'épilepsie encéphalopathique, est l'équivalent de la position E26 sur GLIC (Shen et al., 2008). Sur la sous-unité δ du récepteur musculaire, la mutation L42P caractérisée chez une patiente est l'équivalent de la cystéine endogène de GLIC C27. Cette mutation a été étudiée en détail, elle produit des récepteurs qui présentent des périodes d'activité anormalement courte à cause d'une cinétique d'activation ralentie. La mutation en proline du résidu adjacent N41P donne le même phénotype (équivalent de E26). D'autres mutations de cette interface ont été caractérisées par ailleurs et induisent ce même effet de diminution de la cinétique d'activation. L'interdépendance de ces résidus déterminé par calcul d'énergie libre indique qu'il existe une interaction entre les résidus N41, L42 et Y127 sur la sous unité adjacente. La tyrosine 127 est l'équivalent de la leucine 111 de GLIC dont le carbonyle interagit via des réseaux de molécules d'eau avec E26. Il serait intéressant d'approfondir l'étude de la réponse de GLIC en canal unique avec la mutation E26Q pour établir si ces interactions inter sous-unités sont également importantes pour la cinétique d'activation. Il est remarquable que ces interactions soient conservées parmi les RCPs et documentent l'homologie des transitions des différents récepteurs.

Une autre mutation P250T sur GlyR $\alpha 1$, responsable d'hyperekplexie est située tout en bas de M2, au niveau du point de constriction en -2'. En électrophysiologie, cette mutation montre un décalage de la courbe dose réponse à la glycine et une augmentation marquée de la cinétique de désensibilisation (Saul et al., 1999). En analysant la localisation de cette mutation, les auteurs de l'étude prédisent que la charnière créée par la proline en

configuration *cis* en bas de l'hélice est importante pour la stabilisation de l'état actif et que la perturbation par une thréonine impacterait l'orientation de ce résidu. Bien que GLIC ne possède pas de proline à ce niveau du canal et que sa désensibilisation soit peu caractérisée, il est possible qu'un mécanisme local similaire ait lieu dans le cas de la mutation E222Q. La perturbation du point de constriction peut entraîner une modification de la structure en hélice du bas de M2 et engendrer l'effet global sur les réorganisations de l'ECD de GLIC observées par fluorescence.

Discussion

L'approche de quenching de la fluorescence par les tryptophanes et tyrosines permet dans cette étude d'analyser l'impact de mutations sur les conformations et les transitions de GLIC. La mutation de résidus impliqués dans des interactions clés pour la stabilisation de l'état actif impacte profondément les réorganisations globales de la protéine.

Les mutations D32E, H235Q et E222Q situées en bas de l'ECD, au milieu et en bas de l'hélice M2 ont un effet à distance sur la compaction du domaine extracellulaire à l'autre extrémité de la protéine en haut de l'ECD. De la même manière le propofol se liant en haut du TMD inhibe la compaction de l'ECD ou bien la favorise dans le cas du mutant H235Q particulièrement sensible à l'effet potentialisateur du propofol. Ces données montrent des couplages longue distance qui sont cohérents avec des transitions allostériques globales de la protéine, en accord avec le modèle MWC.

La mutation H235F abolit complètement la fonction de GLIC et les données de fluorescence sont en accord avec les structures cristallographiques de ce mutant, qui est stabilisé dans une conformation LC1 à bas pH. Dans la conformation LC1, les mouvements de l'ECD sont complets mais ceux du TMD ne sont pas effectués, la boucle M2M3 est dans l'état de repos et le canal est fermé. La mutation H235F perturbe des interactions clefs entre M2 et les hélices adjacentes dans l'état actif, défavorisant son mouvement de *tilt*. Cette perturbation s'étend au reste de la protéine, empêche le mouvement de M2M3 et défavorise la compaction de l'ECD.

Les mutations L157A et L246A produisent également des récepteurs non fonctionnels, mais cette fois les mouvements caractérisés par fluorescence indiquent des conformations inédites de la protéine. À bas pH, la compaction de l'ECD est très partielle mais la boucle

M2M3 a effectué l'intégralité du mouvement. La sensibilité au proton de GLIC est encore mal comprise, et implique plusieurs sites distincts, aucun n'étant strictement nécessaire à l'activation (Nemecz et al., 2017). D'après les analyses par mutagenèse, la région clé d'activation par les protons est localisée à l'interface ECD-TMD et la perturbation locale entraînée par les mutations L157A et L246A affecte la transmission du signal. En déstabilisant des interactions spécifiques de l'état actif entre le TMD et l'ECD (L246A), ou bien à la base du corps hydrophobe du sandwich β de l'ECD (L157A), les mutations semblent autoriser un mouvement proton-dépendant à l'interface ECD-TMD mais ce mouvement n'est que partiellement transmis à l'ECD et au canal.

Enfin, les mutations au niveau du bas de l'ECD des résidus 26-27-28 ont un effet structural non seulement sur les transitions allostériques, mais aussi sur l'état de repos. Ces données renforcent l'idée que l'état de repos de GLIC est hautement dynamique et a accès à de multiples conformations de l'ECD, où les sandwich β de chaque sous-unité sont partiellement désolidarisés structurellement. Les données de fluorescence suggèrent que la perturbation des interfaces entre sous-unité à la base de l'ECD a un effet de levier, qui augmente ou diminue les distances inter sous-unité en haut de l'ECD.

Le quenching de la fluorescence est très sensible à la distance entre le fluorophore et le quencher. Cette méthode permet une résolution unique des variations fines de distances qui sont en jeu dans la réorganisation des RCPs et permet de caractériser des conformations qui n'avaient pas été anticipées. Cet avantage peut s'avérer être un inconvénient si le changement de fluorescence rapporte un changement local au niveau de la sonde fluorescente et/ou du quencher. Le mouvement rapporté correspondra alors à une réorganisation structurale locale plutôt que globale. L'interprétation des résultats est donc à prendre avec précaution et la comparaison entre plusieurs paires de quenching, ainsi que la comparaison avec les structures cristallographiques, sont nécessaires pour proposer une interprétation pertinente des données.

Le fait de mesurer la fluorescence d'un ensemble de protéines, limite également le degré d'interprétation des changements de fluorescence en termes de transitions conformationnelles. En effet un nombre inconnu d'états du récepteur sont à l'équilibre à un pH donné, incluant les états de repos, actif, des intermédiaires et possiblement l'état désensibilisé. La mesure de fluorescence étant une moyenne du niveau de fluorescence de

différents états, et il n'est pas possible d'extraire les niveaux de fluorescence de ces différents états sans connaître leurs proportions respectives. La présence éventuelle d'états asymétriques est aussi moyennée par ce type de mesures. Des mesures de temps de vie de fluorescence permettrait de décomposer le signal de fluorescence puisque qu'il est possible d'extraire différentes populations à partir d'analyses multi-exponentielles des cinétiques de décroissance de l'intensité de fluorescence. Une autre possibilité pour faire apparaître différentes populations serait d'effectuer des mesures de fluorescence en molécule unique. Avec les mesures à l'équilibre, on ne peut pas directement différencier si la transition se fait entre quelques états discrets ou bien si elle est constituée d'un continuum d'états intermédiaires, les deux approches par fluorescence en molécule unique ou en temps de vie permettraient d'appréhender ces questions. Des sondes paramagnétiques nucléaires (Kinde et al., 2015) et électroniques (Velisetty et al., 2012) ont été précédemment utilisées dans l'étude des transitions de RCPs. Ces études se sont concentrées sur la dynamique du canal dans la désensibilisation et permettent d'identifier plusieurs populations pour une même condition. Il serait intéressant d'investiguer les réorganisations identifiées par fluorescence sur GLIC en utilisant ces techniques en résonance magnétique nucléaire (RMN) ou résonance paramagnétique électronique (RPE).

La compréhension de l'impact des mutations pathologiques sur la dynamique conformationnelle et les transitions des RCPs est essentielle pour imaginer des modulateurs spécifiques qui corrigeraient l'effet fonctionnel des mutations. De même la compréhension de l'effet structural des modulateurs allostériques connus pourrait permettre une approche plus rationnelle de l'utilisation de ces molécules.

Les données de fluorescence obtenues ici pourraient être associées à d'autres approches par modélisation moléculaire par exemple et approfondies grâce aux diverses techniques décrites dans le paragraphe précédent. L'effet observé de certaines mutations sur l'état de repos n'était pas anticipé mais propose une perspective différente pour décrire les conformations des RCPs. À la manière des études de repliement des protéines on peut représenter les conformations des RCPs par un paysage conformationnel avec des états visités plus ou moins fréquemment selon les conditions et la présence de mutations.

L'effet sur la conformation des mutations est cohérent avec leur effet fonctionnel et certaines mutations semblent conservées entre RCPs procaryotes et eucaryotes. L'étude sur

GLIC peut donner des premières informations sur l'effet de mutations pathologiques. Cependant il existe probablement des différences de mécanismes entre RCPs eucaryotes et procaryotes et il faudrait aussi étudier l'impact des mutations sur la conformation des RCPs humains.

RESULTATS
TROISIEME PARTIE

Étude des transitions de RCPs eucaryotes par Voltage-clamp fluorométrie

Cette partie décrit la mise au point d'une installation de voltage-clamp fluorométrie (VCF) réalisée pendant ma thèse dans le laboratoire et les résultats obtenus avec cet équipement.

Le développement de cette technique a été possible grâce à l'aide et les conseils de nombreuses personnes. Je tiens à mentionner l'aide de Marc Gielen, chercheur au laboratoire qui a conçu la chambre d'enregistrement adaptée à la VCF et celle de Florian Ruckerl, ingénieur dans le département de Neurosciences de l'Institut Pasteur pour l'installation de la partie optique.

Les expériences sur le récepteur à la sérotonine ont été réalisées dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de Hugues Nury, chercheur à l'Institut de Biologie Structurale de Grenoble et ont été publiées (Polovinkin et al., 2018).

Dans l'étude du récepteur glycine, la dernière partie des expériences (effet des mutations) a été possible avec l'aide de Sophie Shi qui a effectué les enregistrements lors de son stage de M2 dans le laboratoire. Ces résultats feront l'objet d'une publication ultérieure.

Le bime et le Bodipy sel de Bunte ont été synthétisés par Emmanuelle Drège chercheuse à l'Université Paris-Sud dans le cadre d'une collaboration avec le groupe de Delphine Joseph.

La voltage-clamp fluorométrie est une technique de choix pour combiner les mesures fonctionnelles par électrophysiologie sur ovocyte de Xénope et les mesures de dynamique structurale par fluorescence. Cette technique permet l'étude des RCPs eucaryotes et constitue la suite logique de l'approche de fluorescence réalisée pour étudier les transitions de GLIC. Dans la littérature, le GlyR est le RCP humain qui a été le plus étudié par VCF et il est le candidat idéal pour commencer nos études. Les études existantes sur les RCPs ont principalement utilisé les ΔF induits par les changements d'environnement des sondes et l'idée dans cette partie est d'étendre l'approche de quenching par les tryptophanes et de caractériser les transitions des eucaryotes en comparaison avec celle de GLIC.

Description du dispositif de voltage-clamp fluorométrie

Plusieurs variantes de montage de voltage clamp fluorométrie ont été utilisées dans les différentes études. Le microscope peut être droit ou inversé, le détecteur de fluorescence est en général un photomultiplicateur mais peut être remplacé par une caméra et/ou couplé à un spectromètre pour obtenir le spectre détaillé d'émission de fluorescence. La source de lumière peut être une LED ou bien une source halogène. Et enfin la chambre d'enregistrement peut permettre de mesurer le courant d'une partie ou de la totalité de l'ovocyte.

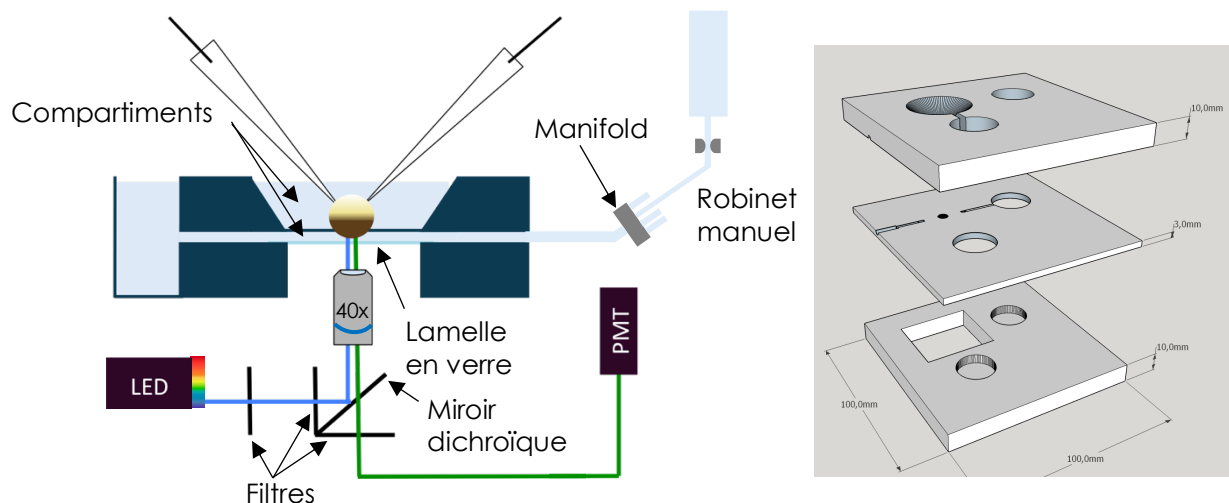


Figure 1. Schéma du poste de Voltage-clamp fluorométrie. À gauche, montage utilisé avec le système de perfusion, les électrodes d'enregistrement, la source lumineuse et le système optique qui fait passer la lumière d'excitation (bleu) jusqu'à l'ovocyte et la lumière d'émission (vert) de l'ovocyte au détecteur (PMT). La chambre de perfusion présente deux compartiments isolés (seul celui du bas est perfusé par l'agoniste) et son plan est détaillé à droite (conception M. Gielen).

Dans notre système, le microscope est inversé, la lumière est collectée à travers un objectif 40x et elle est détectée par un photomultiplicateur (PMT) et une source LED permet l'excitation des fluorophores (Figure 1). Une chambre de perfusion dédiée a été conçue pour enregistrer seulement une partie de l'ovocyte. Dans cette chambre l'ovocyte est disposé sur le trou qui fait la connexion entre deux compartiments. Celui de dessus contient de la solution tampon sans agoniste. Celui du dessous est connecté à un système de perfusion et permet l'application de concentrations d'agoniste et de modulateur variées. Les solutions sont réunies par un manifold et le flux est contrôlé manuellement par des robinets deux voies. Une lamelle en verre referme ce deuxième compartiment et permet la collection de la fluorescence dessous. Seuls les récepteurs exprimés à la membrane de l'ovocyte situés dans le deuxième compartiment peuvent être activés et c'est cette même population qui est enregistrée en fluorescence.

En plus de mesurer la même population de récepteurs en courant et fluorescence, cette chambre donne la possibilité de stimuler d'avantage l'expression des récepteurs à la membrane en augmentant la concentration d'ADN plasmidique à l'injection. Dans une chambre classique, le courant mesuré sur l'ovocyte entier peut devenir trop important et rendre le clamp de l'ovocyte difficile à maintenir, dans le cas de la chambre à 2 compartiments, on peut avoir une plus grande densité de récepteur à la membrane et donc améliorer le signal de fluorescence sans dépasser les 10 μ A de courant puisque l'on active seulement une partie des récepteurs.

Cette chambre présente néanmoins un inconvénient, le débit de perfusion doit être relativement lent pour permettre la stabilité de l'ovocyte pendant l'enregistrement. Un rétrécissement en dessous de l'ovocyte permet un effet venturi qui « aspire » l'ovocyte et le maintien en place. Un débit trop rapide entraîne une tension trop forte sur la membrane de l'ovocyte et il a tendance à se décoller lors du changement de solution (qui donne un bref changement de débit). Une partie de la solution d'agoniste passe alors dans le compartiment du haut et active le reste des récepteurs induisant un artefact dans l'enregistrement (Figure 2). Pour avoir un ovocyte stable dans la chambre d'enregistrement, la vitesse de perfusion a été optimisée à l'aide d'un fluorophore en solution et indique un remplacement de la solution dans la gamme de la dizaine de secondes.

Afin d'optimiser le fonctionnement du poste de VCF et la détection de la fluorescence, un mutant du récepteur glycine décrit dans la littérature a été utilisé. Ce mutant a été

caractérisé pour avoir un ΔF très important en présence de glycine lorsque sa cystéine Q67C est marquée avec le fluorophore TAMRA (clone donné par S. Pless). Une fois les paramètres d'enregistrement établis, d'autres données ont pu être reproduites comme la courbe dose réponse du mutant de GlyR R271C marqué au MTSR, validant ainsi le poste de VCF.

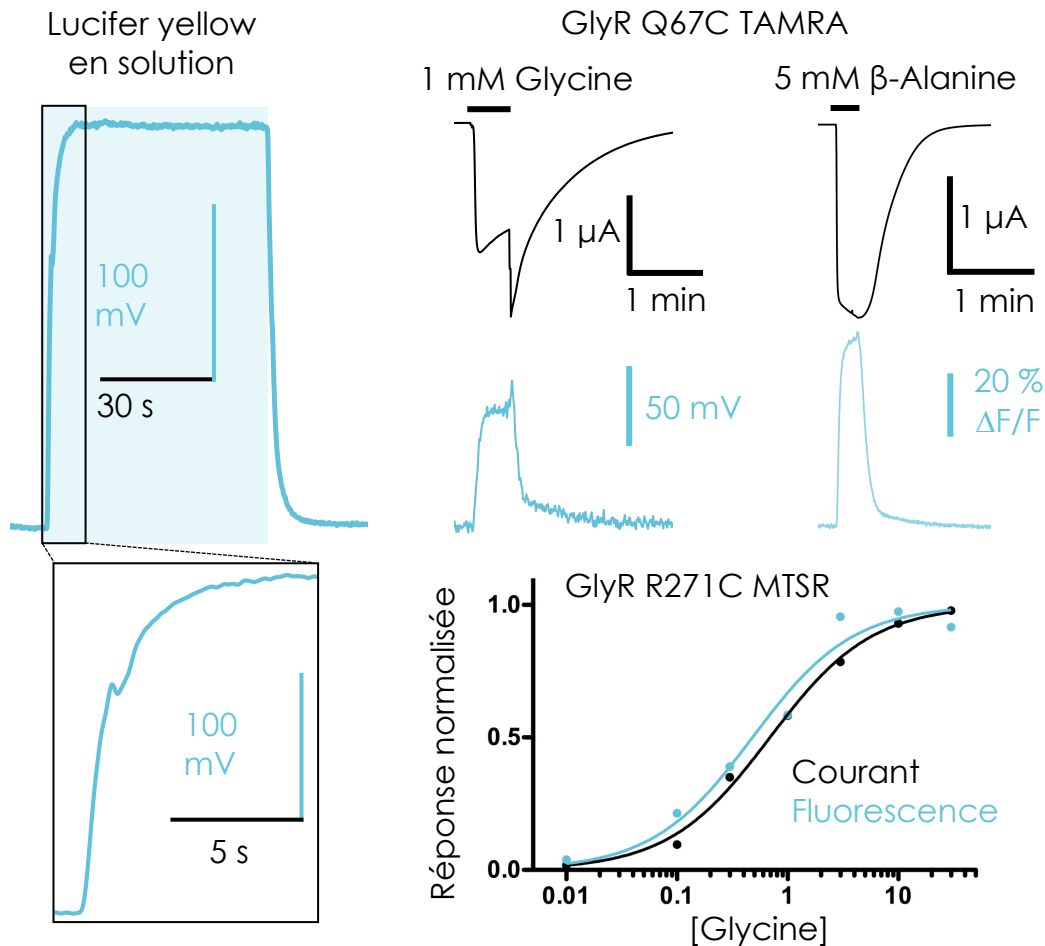
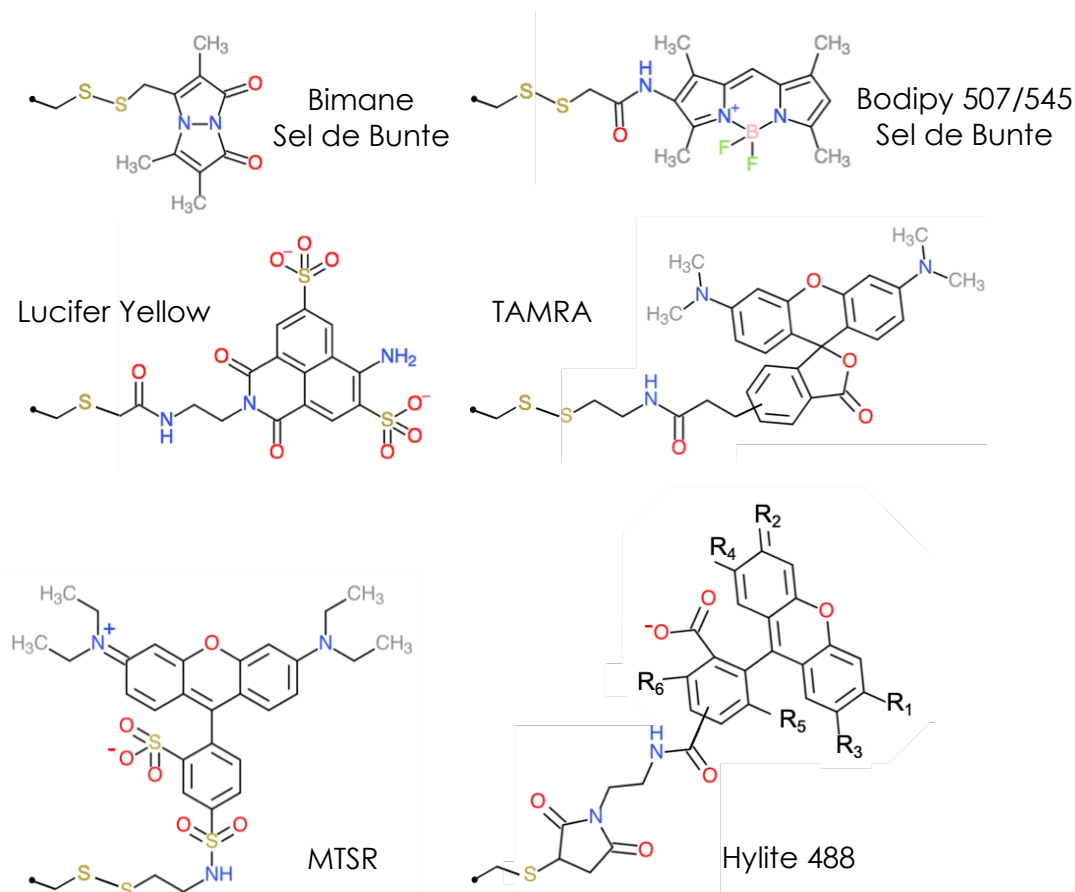


Figure 2. Caractérisation et validation du poste de VCF. En haut à gauche, signal de fluorescence lorsqu'une solution de fluorophore Lucifer Yellow est appliquée (zone en bleue). Le zoom correspond aux 10 premières secondes après le début de l'application du fluorophore indiquant un temps d'échange autour de 7 s. À droite, courant (noir) et fluorescence (bleu) enregistrés simultanément, sur un ovocyte exprimant GlyR Q67C marqué au TAMRA. Le tracé en présence de glycine montre l'artefact de changement de solution lorsque la perfusion est trop rapide. Le signal obtenu par application de β -alanine donne un changement de fluorescence ($\Delta F/F$) du même ordre de grandeur en comparaison avec la littérature (environ 40% pour 3 mM de β -alanine (Pless & Lynch, 2009c)). En bas à droite est représentée la courbe dose réponse du mutant GlyR R271C marqué au MTSR. La superposition des courbes de courant et fluorescence avec un EC_{50} autour de 1 mM reproduit ce qui est décrit dans la littérature (Pless et al., 2007).



	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	Brillance $\Phi \times \epsilon$	Quenching
Bimane	385	483	1.600	42 %
Bodipy	502	531	86.000	23 %
Lucifer Yellow	422	525	5.100	97 %
TAMRA	551	573	~ 60.000	32 %
MTSR	570	585	~ 60.000	40 %
Hylite 488	500	525	64.000	30 %

Figure 3. Structure après réaction sur cystéine des fluorophores testés en VCF. Les structures sont représentées à la même échelle, après réaction sur une chaîne latérale de cystéine (le point noir indique le Ca de la cystéine). Le Hylite 488 est un dérivé de l'Alexa fluor 488 dont la structure exacte est protégée. Le tableau résume les caractéristiques de ces fluorophores avec les longueurs d'onde d'excitation et d'émission mesurées en solution après réaction avec des cystéines en solution. Le % de quenching est mesuré également en solution avec une concentration de 12,5 mM de tryptophane. La brillance est donnée à titre indicatif et les valeurs proviennent des caractéristiques données par le fournisseur et de la littérature.

Caractérisation des fluorophores pour l'utilisation en VCF

Les fluorophores couramment utilisés pour la VCF sont des dérivés de la rhodamine : TAMRA, MTSR et TMRM ou des Alexa fluor 488 et 546 ; mais d'autres fluorophores peuvent être utilisés dans le cadre du développement du quenching par le tryptophane en VCF. Les structures de ceux utilisés dans le cadre de ce projet ont des tailles et des propriétés variables (Figure 3). Les fluorophores utilisés dans la littérature ont été sélectionnés car ils possèdent plusieurs caractéristiques. Ils sont suffisamment brillants pour être détectés au-delà du bruit de fond sur les ovocytes, et sont particulièrement sensibles à leur environnement ce qui permet d'observer des ΔF induits par des changements de conformation. À ces caractéristiques, on peut ajouter le fait d'avoir un groupement réactif qui permet un marquage efficace des cystéines, et une sensibilité au *photobleaching* qui n'est pas trop importante. Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission peuvent aussi avoir leur importance car la fluorescence endogène des ovocytes mesurée avec notre dispositif est variable selon la longueur d'onde (Figure 4). Une étude récente montre également que cette fluorescence endogène peut être très variable selon les lots d'ovocytes (Lee & Bezanilla, 2019). Si un fluorophore peu brillant est utilisé, il est préférable de se trouver dans les zones où le signal endogène non spécifique est minimal c'est-à-dire autour de 470 nm.

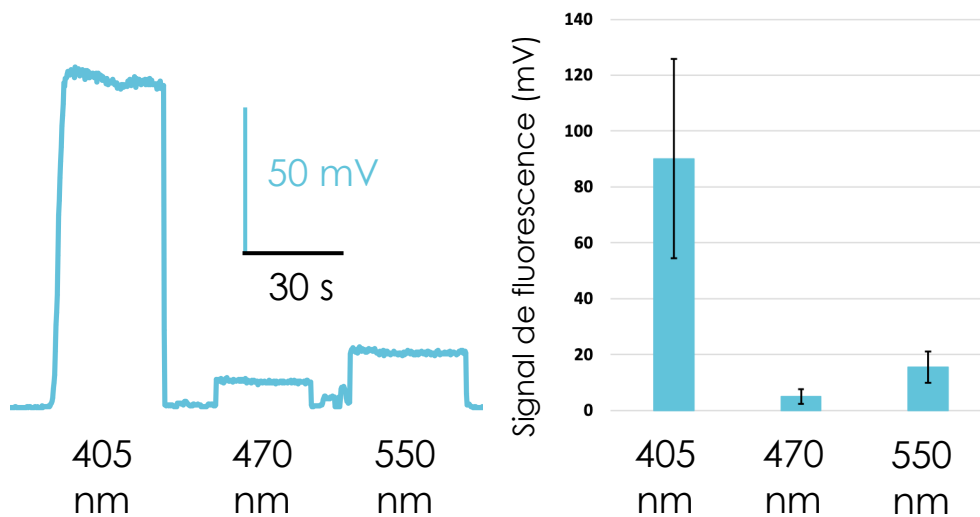


Figure 4. Signal endogène de fluorescence en fonction de la longueur d'onde. Intensité du signal de fluorescence sur des ovocytes non marqués, en utilisant les différents filtres du poste de VCF adaptés pour les différents fluorophores. À gauche, signal sur un ovocyte et quantification à droite sur 6 ovocytes venant de 2 lots différents.

L'inconvénient des fluorophores commerciaux couramment utilisés en VCF est leur relativement grande taille et la longueur de leur *linker* qui permet le marquage sur la cystéine. Cela complique la prédiction de la position et l'orientation du fluorophore. Il est alors difficile d'associer les ΔF à des changements de conformation précis. Pour utiliser l'approche de quenching par les tryptophanes, l'idée est d'utiliser des fluorophores plus petits pour lesquels on peut prédire plus facilement un partenaire de quenching. Dans la littérature, on trouve un exemple d'utilisation du bimane en PCF (Islas & Zagotta, 2006). Nous avons voulu tester s'il était possible avec notre poste de VCF d'utiliser ce fluorophore, pour cela un mutant de GLIC Q193C a été utilisé. Ce mutant a été caractérisé précédemment pour devenir non fonctionnel lorsque une molécule réagit sur sa cystéine (Menny et al., 2017). Il avait été montré que le monobromobimane ne réagissait pas efficacement sur les cystéines de GLIC exprimé à la membrane d'ovocytes, alors que le Bimane sel de Bunte se lie à Q193C et bloque la quasi-totalité du courant après un marquage de 1h à 1 mM. En reproduisant cette expérience sur le poste de VCF et en regardant la fluorescence, on observe que malgré un niveau de marquage conséquent, il n'y a pas de changement notable de l'intensité de fluorescence ce qui nous indique que le bimane n'est pas suffisamment brillant pour voir sa fluorescence sortir du bruit de fond (Figure 5). L'utilisation d'un autre fluorophore est alors nécessaire.

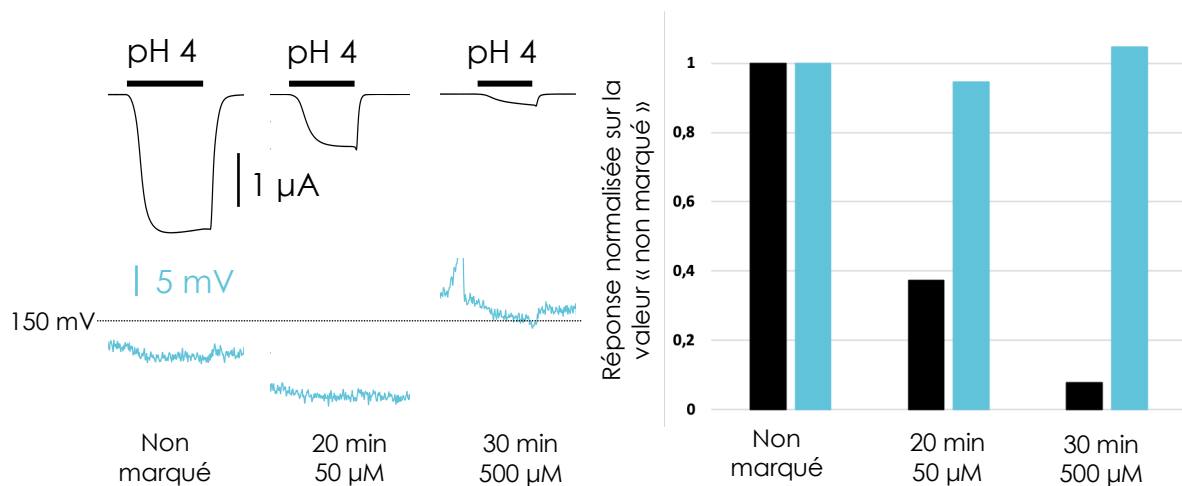


Figure 5. Marquage au Bimane sel de Bunte de GLIC Q193C. Tracés en VCF et quantification du courant (noir) et de la fluorescence (bleu) de GLIC Q193C avant marquage et après deux étapes de marquage successives au bimane sel de Bunte de 20 min à 50 μM puis 30 min à 500 μM . La diminution du courant indique la réaction du bimane sur la cystéine en position 193. L'intensité de fluorescence ne varie pas de manière significative après marquage ce qui signifie que la fluorescence du bimane est dans le bruit de fond de la fluorescence endogène.

Plusieurs autres fluorophores en plus de ceux classiquement utilisés en VCF ont été testés en solution pour établir s'ils pouvaient être quenchés par le tryptophane et leurs différentes caractéristiques ont été collectées (Figure 3). Ils montrent tous une sensibilité au quenching par le tryptophane plus ou moins importante en solution. Pour savoir s'il est possible d'anticiper l'orientation de la sonde fluorescente afin de concevoir des paires de cystéine-tryptophane efficacement, des tests ont été effectués sur protéine purifiée. Le mutant de GLIC R133C qui se trouve au niveau du site orthostérique a précédemment été marqué au bimane avec le tryptophane à différentes positions. Un tryptophane en position L103W rapporte efficacement la compaction de l'ECD mais en position 23, 44 et 101, il est trop éloigné du bimane pour observer un quenching (Figure 6). Les fluorophores Bodipy et Lucifer Yellow étant plus grand que le bimane, leur capacité à être quenché par le tryptophane en position 23, 44 et 101 a été testé. Pour le Bodipy, la fluorescence est stable dans la gamme de pH 7-3 en absence de tryptophane, et la fluorescence diminue dans l'état de repos pour les 3 positions du tryptophane testées, comme c'est le cas pour le bimane avec L103W. Avec Y23W, le quenching est déjà à son maximum à pH 6 alors qu'on mesure un quenching pH-dépendant pour Q101W et S44W. Pour le Lucifer Yellow, on observe un quenching pH-dépendant bi-phasique en absence de tryptophane qui est similaire à celui observé aux différentes positions du tryptophane. Il est possible que le Lucifer Yellow soit quenché par la Y23 (et de manière similaire par Y23W) ou bien que le fluorophore soit sensible à un changement d'environnement indépendant du quenching. Ces mesures confirment que l'utilisation de fluorophore plus grand / avec un linker plus long rendent l'interprétation des ΔF et la conception de paires Cys-Trp plus complexe. En revanche le Bodipy qui a l'avantage d'être beaucoup plus brillant que le bimane est a priori un bon candidat pour l'étude en quenching.

En utilisant la même approche que pour le bimane, un Bodipy sel de Bunte (sBPY) a été synthétisé dans le but d'obtenir un fluorophore moins hydrophobe pour espérer marquer spécifiquement les récepteurs surexprimés à la membrane. Malgré cette modification, des essais de marquage sur cellule montrent que le fluorophore reste très hydrophobe et partitionne dans les membranes. Pour évaluer si ce sBPY peut être utilisé en VCF, le test du marquage sur GLIC Q193C a été effectué (Figure 7). Il montre une perte du courant de plus de 90% après un marquage à 50 μM pendant 20 min. Un marquage plus court ou avec une concentration plus faible diminue cette efficacité de marquage. Dans ces conditions, le niveau

de fluorescence est similaire sur des ovocytes exprimant GLIC et sur des ovocytes non injectés ce qui signifie que le signal mesuré en fluorescence après marquage est un mélange de marquage spécifique et non spécifique. On peut imaginer l'ajout d'autres groupements chargés sur le Bodipy pour le rendre encore moins hydrophobe et permettre un marquage spécifique mais ce fluorophore ne peut pas être utilisé pour l'instant dans sa version sel de Bunte.

Le Lucifer Yellow a été testé de la même manière mais n'a pas montré de perte de courant significative sur GLIC Q193C et n'a donc pas été utilisé par la suite. Les fluorophores TAMRA et Hylite 488 (similaire à l'Alexa 488) montrent un marquage sur Q193C et une intensité de fluorescence supérieure par rapport aux ovocytes non injectés (Figure 8). Ces deux fluorophores permettent un marquage spécifique significatif compatible avec la VCF.

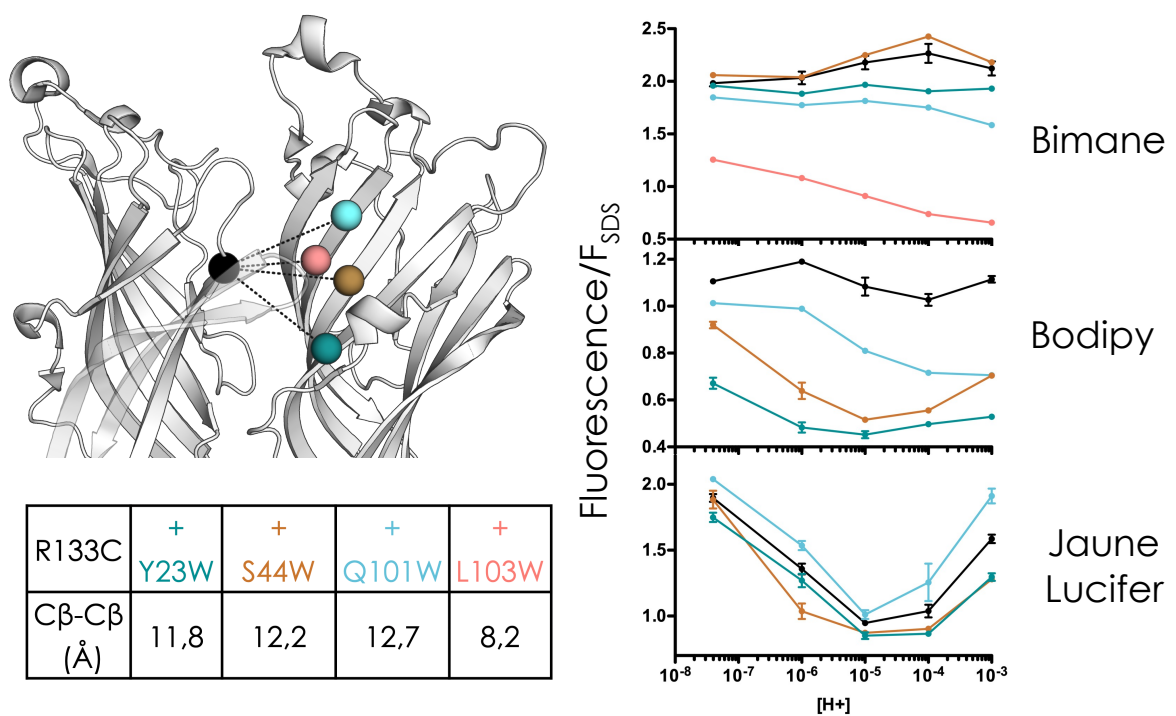


Figure 6. Influence de la longueur du fluorophore sur le quenching. À gauche position dans le haut de l'ECD de GLIC (deux sous-unités à pH 4) du bimane en R133C représenté en sphères. Sur la sous unité de droite, les différentes positions du tryptophane testées. Le tableau indique les distances entre les Cβ de R133 et des positions du tryptophane. À droite, résultats en fluorescence sur protéine purifiée marqué en R133C au Bimane, Bodipy ou lucifer Yellow.

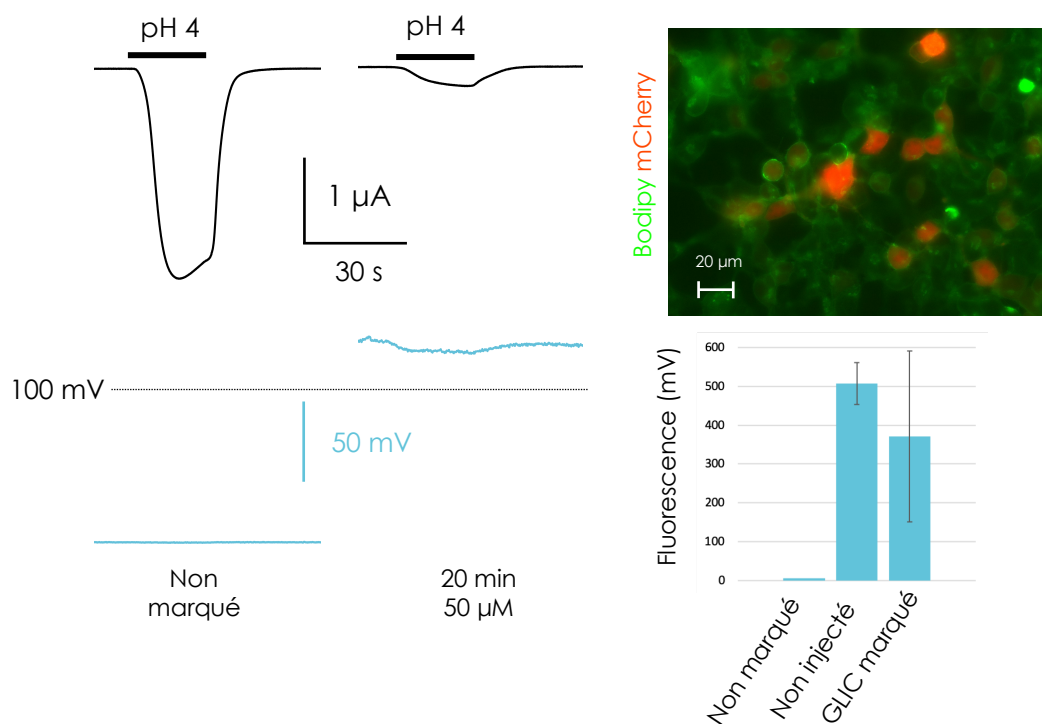


Figure 7. Marquage par le Bodipy sel de Bunte sur GLIC Q193C. À gauche, tracé de VCF avant et après marquage par le Bodipy sel de Bunte sur GLIC Q193C. La diminution du courant indique la réaction de bodipy sur la cystéine, le niveau de fluorescence augmente significativement après marquage. L'image prise par microscopie montre des cellules CHO (Chinese Hamster Ovaries) co-transfectées avec de la mCherry et GLIC D136C. Après un marquage au Bodipy de 30 min à 10 μ M, on voit pour toutes les cellules mêmes celles qui n'ont pas été transfectées (non positives à la mCherry) un marquage à la membrane qui indique une partition du fluorophore dans la membrane qui ne permet pas d'effectuer un marquage spécifique. La même observation est faite sur les ovocytes avec l'histogramme montrant une intensité de fluorescence similaire après marquage d'ovocytes exprimant ou non GLIC 193C.

Les fluorophores disponibles pour la VCF sont finalement ceux utilisés dans la littérature, ils ont une taille importante et possèdent un grand linker.

Le TAMRA et le Hylite 488 sont sensibles au pH dans la gamme utilisée pour activer GLIC. Ils montrent tous les deux un ΔF avec une application à pH 4 sur GLIC Q193C et sur d'autres positions. Ce changement de fluorescence est probablement dû à la sensibilité du fluorophore au pH ou à une protonation des résidus dans l'environnement du fluorophore et des ΔF spécifiques à un changement de conformation défini n'ont pas pu être mis en évidence. Dans la suite de l'étude, les efforts ont été concentrés sur l'approche conventionnelle de VCF avec le TAMRA d'abord sur le récepteur Sérotonine pour permettre d'assigner des structures

à des états physiologiques, puis sur le récepteur Glycine pour étudier les réorganisations durant l'activation en appliquant l'approche de quenching par le tryptophane.

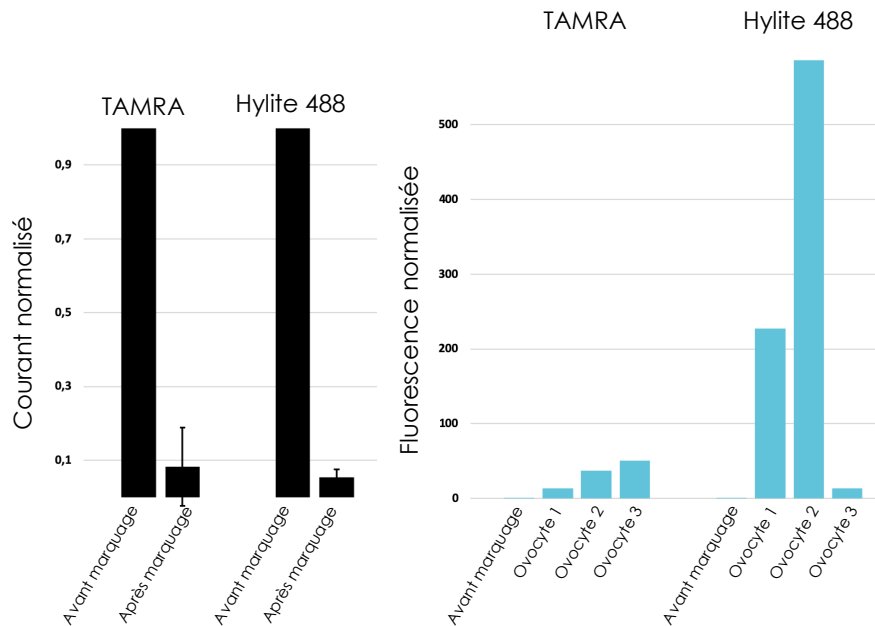


Figure 8. Marquage au TAMRA et Hylite 488. Courant et intensité de fluorescence normalisée avant marquage sur des ovocytes exprimant GLIC Q193C. La diminution du courant indique la réaction du fluorophore sur la cystéine. Pour les deux fluorophores, le signal de fluorescence est significativement augmenté après marquage. En comparaison avec le Hylite 488, le TAMRA est moins brillant mais le niveau de marquage semble plus reproductible.

La VCF pour l'assignement des structures du 5-HT₃R

Comme cela a été décrit dans l'introduction, un essor de la résolution des structures des RCPs eucaryotes a eu lieu ces dernières années. Avec la Cryo-microscopie électronique, il a été possible de résoudre les RCPs dans plusieurs conformations et parfois celles-ci sont difficiles à assigner précisément à des états. En 2018, l'équipe de Hugues Nury a obtenu 4 structures du récepteur à la sérotonine 5-HT₃R A de souris par cryo-EM. Une en présence de l'antagoniste tropisétron (T) ; une autre (I2) en présence de l'agoniste sérotonine (5-HT) et du trans-3-(4-methoxyphenyl)-n-(pentan-3-yl)acrylamide (TMPPAA), un potentialisateur des 5HT₃R qui réduit la désensibilisation et enfin l'analyse des données obtenues en présence seulement de sérotonine ont donné deux conformations (I1 et F) (Figure 9). L'analyse des structures donne des indications sur l'état du récepteur dans les conformations qui ont été caractérisées. Des études de perméation par modélisation moléculaires indiquent si le canal est hydraté et si des ions peuvent le traverser. Mises en commun, ces informations

permettent d'assigner facilement la conformation en présence de tropisétroton (T) à un état inhibé qui est très similaire à l'état Apo obtenu précédemment (Hassaine et al., 2014). Une des deux conformations en présence de sérotonine a un canal ouvert et représente l'état actif (F). Il reste deux conformations en présence de sérotonine et sérotonine + TMPPAA qui présentent un canal fermé (I1 et I2). En présence d'agoniste, deux états sont possibles pour assigner ces conformations non perméantes : un état désensibilisé ou bien un état intermédiaire pré-actif en amont de l'activation. Le fait que le point de constriction dans le canal soit différent pour l'état de repos (9') et l'état désensibilisé (-2') est un consensus établi pour les RCPs anioniques (Gielen et al., 2015) et une structure du GABA_AR β3 présentant ce même point de constriction a été assigné à un état désensibilisé (Miller & Aricescu, 2014). Les deux structures I1 et I2 ont un point de constriction en 9' et la conformation de la partie haute de M2 est plus proche de l'état (T) que de l'état (F). En étudiant la dynamique du haut de M2, il est alors possible d'assigner les conformations I1/2 à un état pré-actif ou désensibilisé.

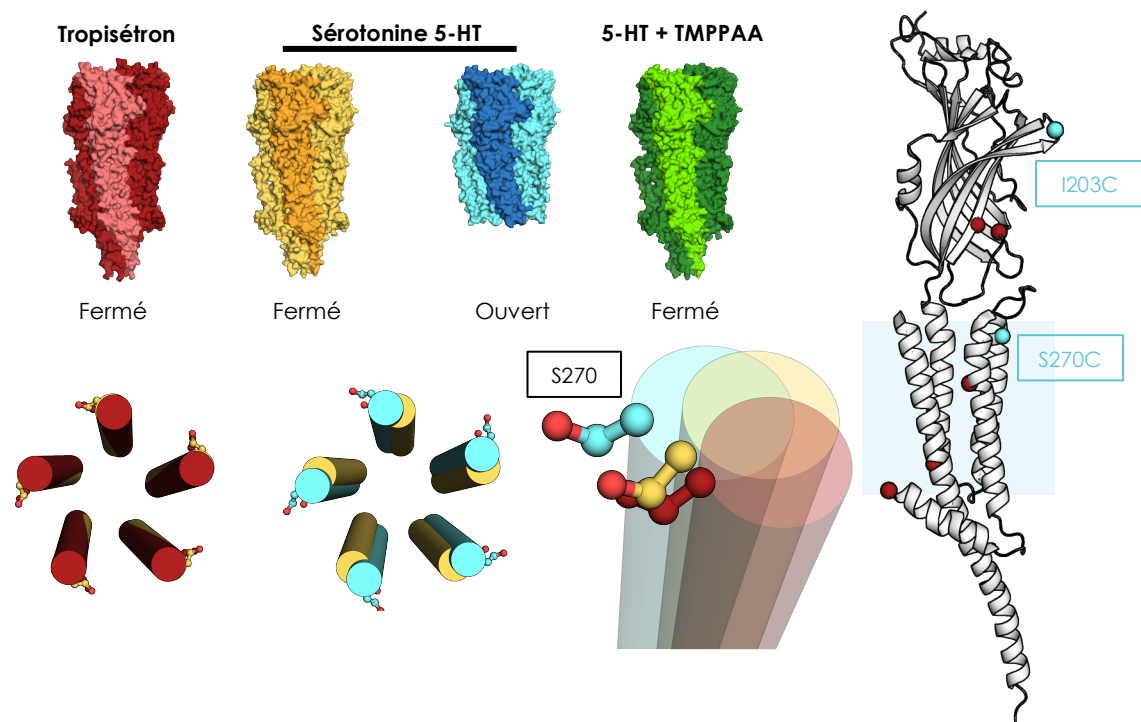


Figure 9. Structures obtenues par cryo-microscopie électronique du 5-HT₃R. En haut les quatre structures résolues en présence de tropisétroton, sérotonine et TMPPAA. À droite, une sous-unité du 5-HT₃R montrant la position des cystéine utilisées pour le marquage au TAMRA (sphères bleues) et les cystéines endogènes (sphères rouges). En bas, superposition des hélices M2 vues de haut et de côté des structures inhibée (rouge), active (bleue) avec celles présentant un canal fermé obtenue en présence de sérotonine (jaune). La sérine S270, mutée en cystéine pour cette étude, montrée en sphères et bâtons est plus proche de la structure inhibée que de celle représentant l'état actif.

Pour répondre à cette question, l'approche de VCF a été choisie. Le haut de M2 a déjà été étudié auparavant sur d'autres RCPs : GlyR et GABA_AR α 1 (Pless et al., 2007; Q. Wang et al., 2010). Pour les deux récepteurs, les positions 19' (GlyR) et 20' (GABA_AR) ont reporté un ΔF associé à l'activation et c'est cette position qui a été sélectionnée sur le 5-HT₃R. Comme il n'y a pas d'études précédentes de VCF sur ce récepteur, une caractérisation préliminaire a été effectuée. Les cystéines endogènes dans l'ECD de ce récepteur forment des ponts disulfures et celles du TMD et de l'ICD sont probablement inaccessibles. Le marquage au TAMRA à 10 μ M pendant 5 min sur le récepteur sauvage montre un léger ΔF positif pendant l'application de sérotonine aux plus hautes concentrations (Figure 10). Si le fluorophore partitionne dans la membrane, il est possible qu'un marquage partiel ait lieu sur les cystéines du TMD, C243 notamment semble faire face aux lipides. Pour avoir un contrôle positif de ΔF sur le récepteur sérotonine, la région où l'on a le plus de chance d'observer un ΔF est le site orthostérique. Une position sur la pointe de la boucle C de GlyR α 1 N203C donne un ΔF robuste lors d'une application de glycine et de l'antagoniste strychnine (Pless & Lynch, 2009b). De manière comparable, la position homologue sur 5TH₃R, I203C donne un ΔF positif important en présence de sérotonine mais aussi de tropisetron. Dans les deux cas sur 5-HT₃R et GlyR, l' EC_{50} en fluorescence est décalé vers les plus hautes concentrations d'agoniste en comparaison avec l' EC_{50} du courant. Le N203C-TAMRA sur le GlyR donne un EC_{50} de 45,7 μ M pour le courant et 526 μ M pour la fluorescence (Pless & Lynch, 2009b). Pour le 5TH₃R le décalage est seulement d'un facteur 2 entre l' EC_{50} du courant (0,92 μ M) et de la fluorescence (2,61 μ M).

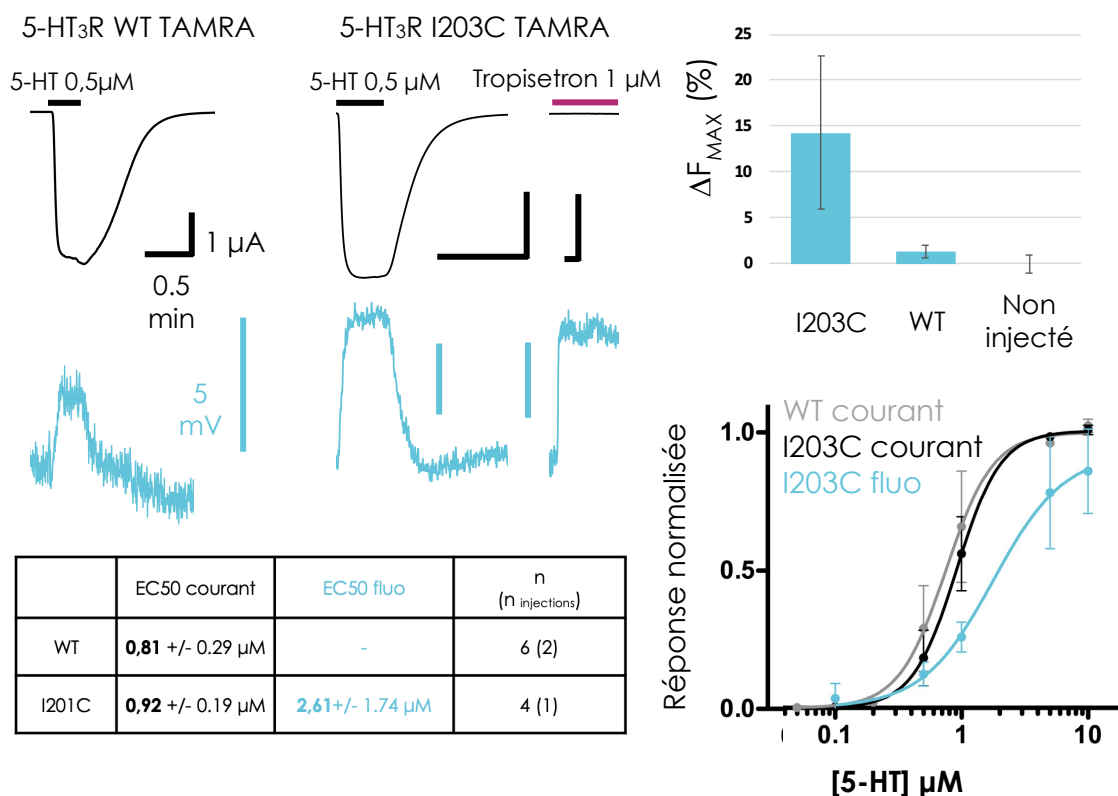


Figure 10. Enregistrement du 5HT₃R en VCF, contrôles négatif et positif. À gauche, exemple de tracés obtenus en VCF pour le récepteur sauvage et le mutant I203C marqués au TAMRA. L'histogramme représente les ΔF maximums obtenus pour la concentration la plus grande en 5-HT dans les différents enregistrements pour les récepteurs sauvage, et mutant I203C et sur les ovocytes non-injectés pour évaluer le bruit de fond. En bas, les courbes dose-réponse sont présentées à droite et le tableau résume les EC₅₀ issus des analyses.

En marquant les ovocytes exprimant le mutant S270C (19') dans les mêmes conditions que précédemment (10 μM pendant 5 min), on obtient un léger ΔF positif similaire au récepteur sauvage, comme si le TAMRA ne réagissait pas sur la cystéine S270C dans ces conditions (Figure 11). Étant donné la conformation qu'adopte la sérine entre l'état au repos/inhibé, on peut supposer que la cystéine mutée à cette position n'est pas accessible au marquage dans l'état de repos et qu'elle l'est davantage dans l'état actif. En effectuant le marquage 10 μM pendant 5min, en présence de sérotonine, on observe cette fois ci un ΔF négatif indiquant que pour cette position, l'efficacité de marquage est conformation dépendante. Une pré-application de tropisetron, qui inhibe le courant évoqué par la sérotonine, inhibe également le ΔF indiquant que ce ΔF est bien spécifique de l'activation.

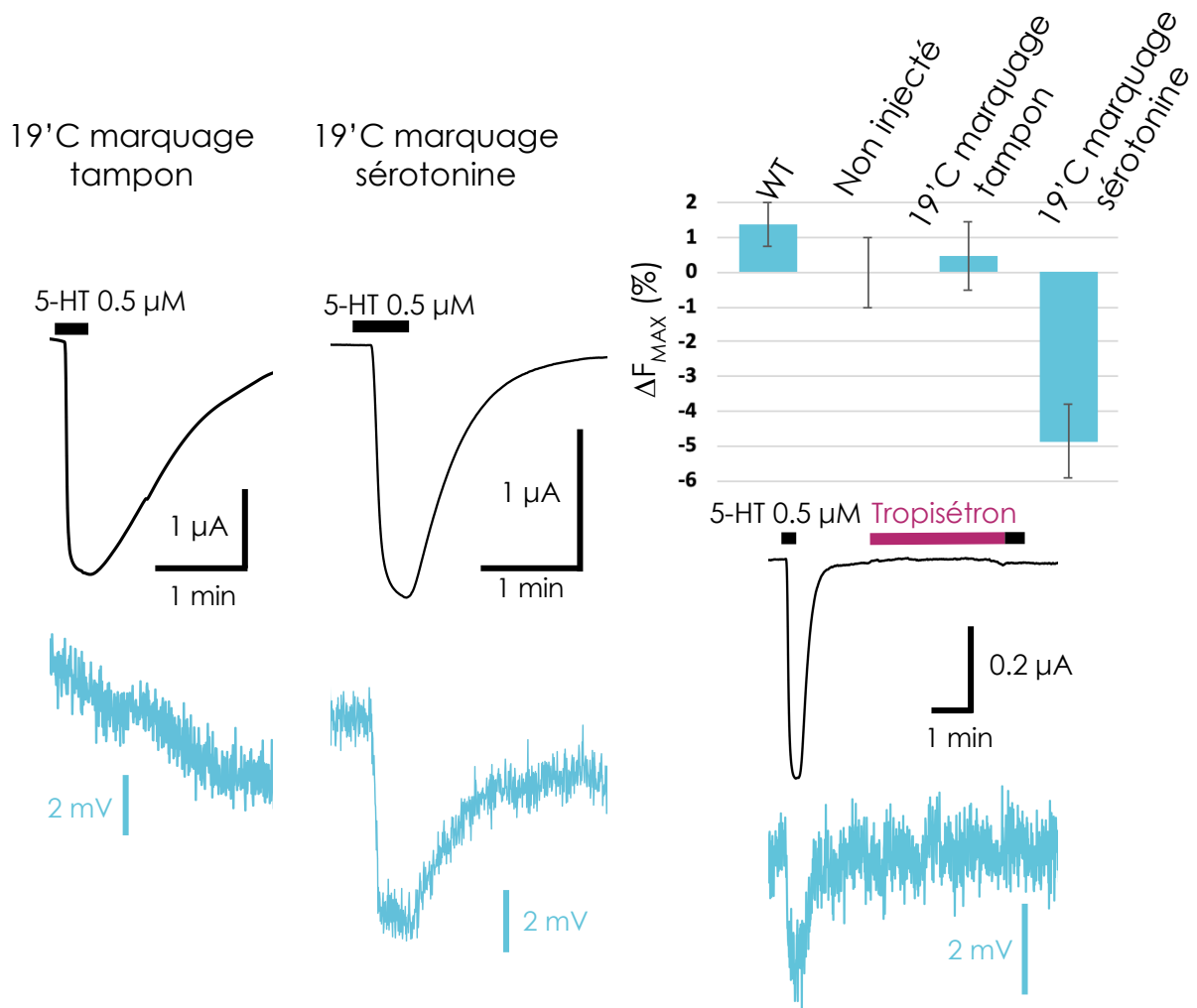


Figure 11. Marquage au TAMRA du S19'C. Tracés de VCF après marquage au TAMRA en solution tampon ou en présence de sérotonine d'ovocytes exprimant 5-HT₃R S19'C. L'histogramme montre les ΔF maximums obtenus pour la concentration la plus grande en 5-HT dans les différentes conditions de marquage pour les récepteurs sauvage et S19'C. En bas à droite, tracé obtenu en présence de 5-HT, la pré-application de tropisetron 1 μM abolit le courant et le ΔF .

La courbe dose réponse en courant est décalée de 3x environ vers les plus faibles concentrations d'agoniste, et la désactivation des récepteurs marqués est visiblement plus lente pour les concentrations en sérotonine à 10 μM (Figure 12). Cela indique que le marquage avec le TAMRA en S19'C stabilise l'état actif. La courbe de fluorescence est elle aussi décalée vers les plus faibles concentrations d'agoniste par rapport à celle du courant de S270C. Un autre moyen d'observer le fait que la fluorescence apparaît à des concentrations de sérotonine plus faible est de regarder la cinétique d'apparition du courant et de la fluorescence. Comme nous l'avons vu dans la partie description du poste de VCF, le débit de

perfusion est relativement lent. On peut voir l'application de sérotonine à 0,5 μM non pas comme un saut de concentration instantané de 0 à 0,5 μM mais comme un gradient de concentration qui dure une dizaine de seconde pour arriver à un plateau à 0.5 μM . Si l' EC_{50} de fluorescence est plus bas que celui de courant, alors le changement de fluorescence sera plus rapide que l'apparition de courant. C'est ce que l'on observe pour ce mutant et cela a été vérifié par la suite sur différents mutants du récepteur glycine pour lesquels il y a aussi une différence d' EC_{50} fluorescence/courant.

Pour répondre à la question de l'assignement des structures à un état pré-actif ou désensibilisé, des applications prolongées de sérotonine ont été effectuées. Une concentration saturante de 10 μM a été utilisée afin d'observer une désensibilisation significative, jusqu'à 70% du courant au pic après quelques minutes d'application. Le ΔF reste stable pendant cette désensibilisation indiquant qu'il n'y a pas de réorganisation majeure à ce niveau de M2 entre l'état actif et l'état désensibilisé. Cela veut dire que la conformation I1 serait bien un état pré-actif, intermédiaire de l'activation. Si I1 était un état désensibilisé, alors on s'attendrait à voir la fluorescence revenir au niveau précédant le début de l'application de sérotonine. Bien évidemment, on ne peut pas exclure qu'une réorganisation ait lieu sans que l'on observe de ΔF . Mais ces résultats s'ajoutent à l'analyse des points de constriction le long du canal et des études d'accessibilité (SCAM) qui ont été réalisées en parallèle de la VCF. Ces données en lien avec les informations de la littérature sur les RCPs forment un faisceau de preuves tendant vers l'assignation à un état pré-actif pour ce travail.

Une dernière observation intéressante sur les expériences d'application prolongée de sérotonine est que l'amplitude du ΔF de désactivation est légèrement plus grande que celui de l'activation. Cela peut être dû à plusieurs phénomènes : un *photobleaching* moins important lorsque le TAMRA est dans l'état actif/désensibilisé par rapport à l'état de repos ; à une réorganisation de très faible amplitude dans l'état désensibilisé qui va dans le même sens que la réorganisation observée à l'activation ; ou bien au recrutement d'une population de récepteurs supplémentaires dans l'état actif avec l'augmentation de la population qui entre dans l'état désensibilisé.

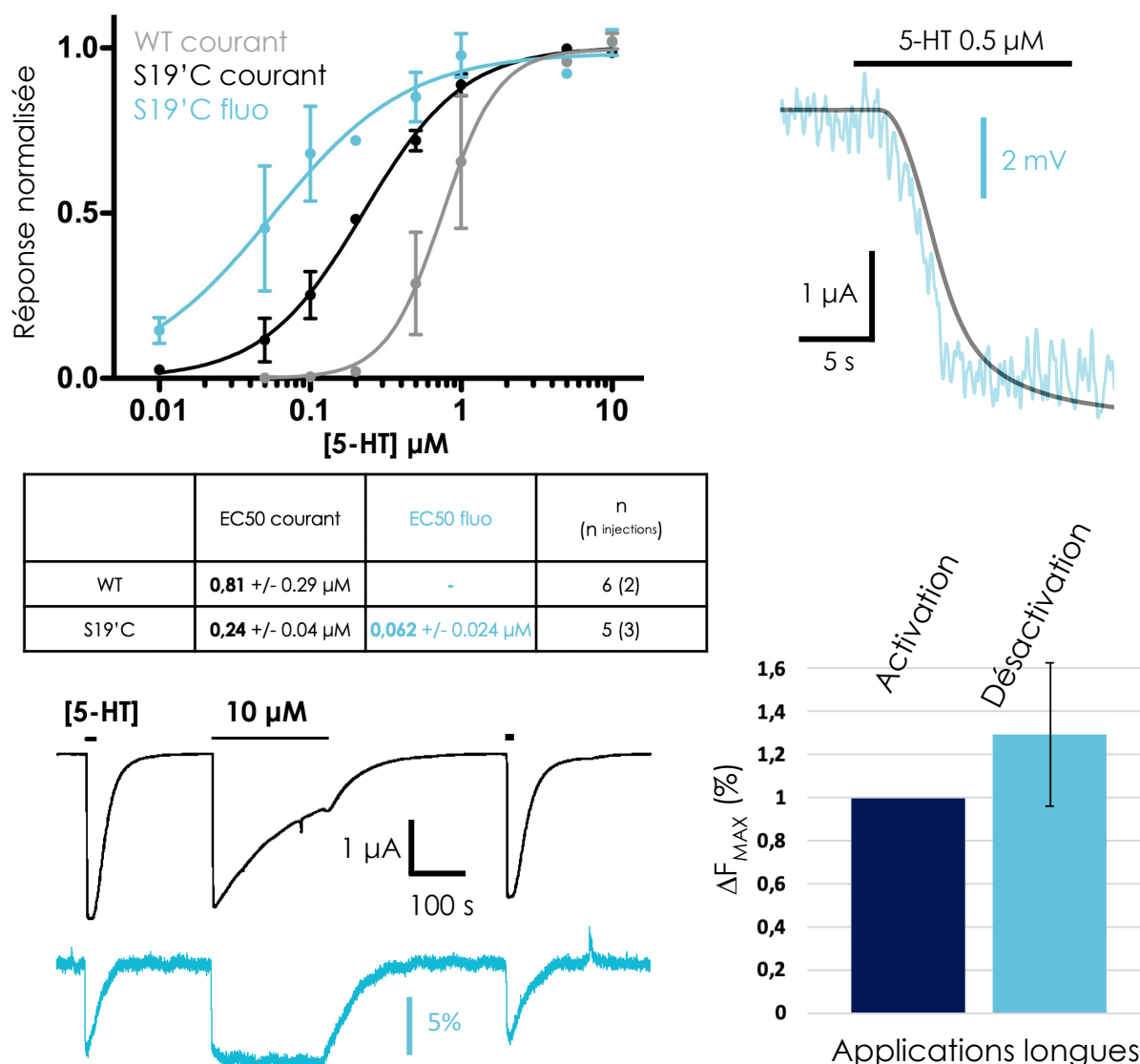


Figure 12. Mouvement du haut de l'hélice M2 pendant l'activation et la désensibilisation.
 En haut à gauche, courbe dose-réponse en courant et fluorescence en fonction de la concentration en sérotonine et tableau récapitulatif des analyses. À droite, zoom sur le début de l'application de 5-HT montrant une cinétique d'apparition du ΔF plus rapide que le courant. En bas, tracé de VCF pendant une application longue de 5-HT montrant un ΔF stable pendant la désensibilisation et à droite, quantification des ΔF d'activation et de désactivation.

Dans cette étude, il a pu être montré tout d'abord que le récepteur sérotonine est un bon candidat pour l'étude des changements de conformation par VCF car cette technique n'avait pas été testée auparavant sur ce récepteur. C'est aussi une bonne illustration de la pertinence de l'utilisation de la VCF dans l'interprétation des structures des RCPs. Avec l'augmentation du nombre de conformations disponibles, on peut imaginer qu'un recours à cette technique pour la question de l'assignement de structures sera de plus en plus fréquent.

Les structures et les résultats obtenus en VCF donnent une première caractérisation structurale d'un état pré-actif du 5-HT₃R. Cette conformation présente un ECD similaire à celui de la conformation active et le mouvement de la boucle M2M3 ne semble en revanche pas avoir autant d'importance que dans les transitions de GLIC. La différence se situe surtout au niveau et de la conformation du TMD qui est similaire dans l'état intermédiaire et l'état inhibé par le tropisetron, la réorganisation du haut de M2 qui n'a pas encore eu lieu semble être l'élément clé pour la transition entre l'état intermédiaire et l'état actif.

La VCF pour l'étude des transitions de GlyR

Rationnel de la conception de paires Cystéine-Tryptophane

Dans cette étude il a été choisi de travailler sur le récepteur homomérique $\alpha 1$ humain pour lequel l'approche par VCF a été la plus développée. La première étape pour effectuer des études de GlyR par VCF est de concevoir des positions de Cystéine/Tryptophane. Pour cela des stratégies différentes ont été utilisées au cours de ma thèse. Une partie des mutants a été réalisée sur un fond sauvage avec les cystéines endogènes de GlyR. Sur le GlyR $\alpha 1$ humain, 4 cystéines sont engagées dans deux ponts disulfures dans l'ECD (Cys-loop et boucle C). On trouve ensuite une cystéine seule dans l'ECD C41, sur le feuillet β de la sous-unité complémentaire au niveau du site orthostérique. Cette Cystéine est mutée en alanine dans la plupart des études de VCF, cependant elle est orientée vers l'intérieur du sandwich β et n'est probablement pas accessible au marquage. Des tests de marquage au TAMRA ont montré qu'il n'y a pas de ΔF induit par un marquage éventuel de cette cystéine (Figure 13), celle-ci a donc été conservée pour une partie des mutants et mutée en serine pour le reste (cette mutation n'affecte pas significativement la fonction). Deux autres cystéines endogènes sont présentes, une dans le TMD (M3) et l'autre dans l'ICD, elles sont conservées dans les études de VCF car non accessible pour être marquées. Une partie des mutants a aussi été réalisé sur une construction pour laquelle un Strep II tag a été rajouté en C-terminal de manière similaire à GlyR $\alpha 3$ (X. Huang et al., 2015).

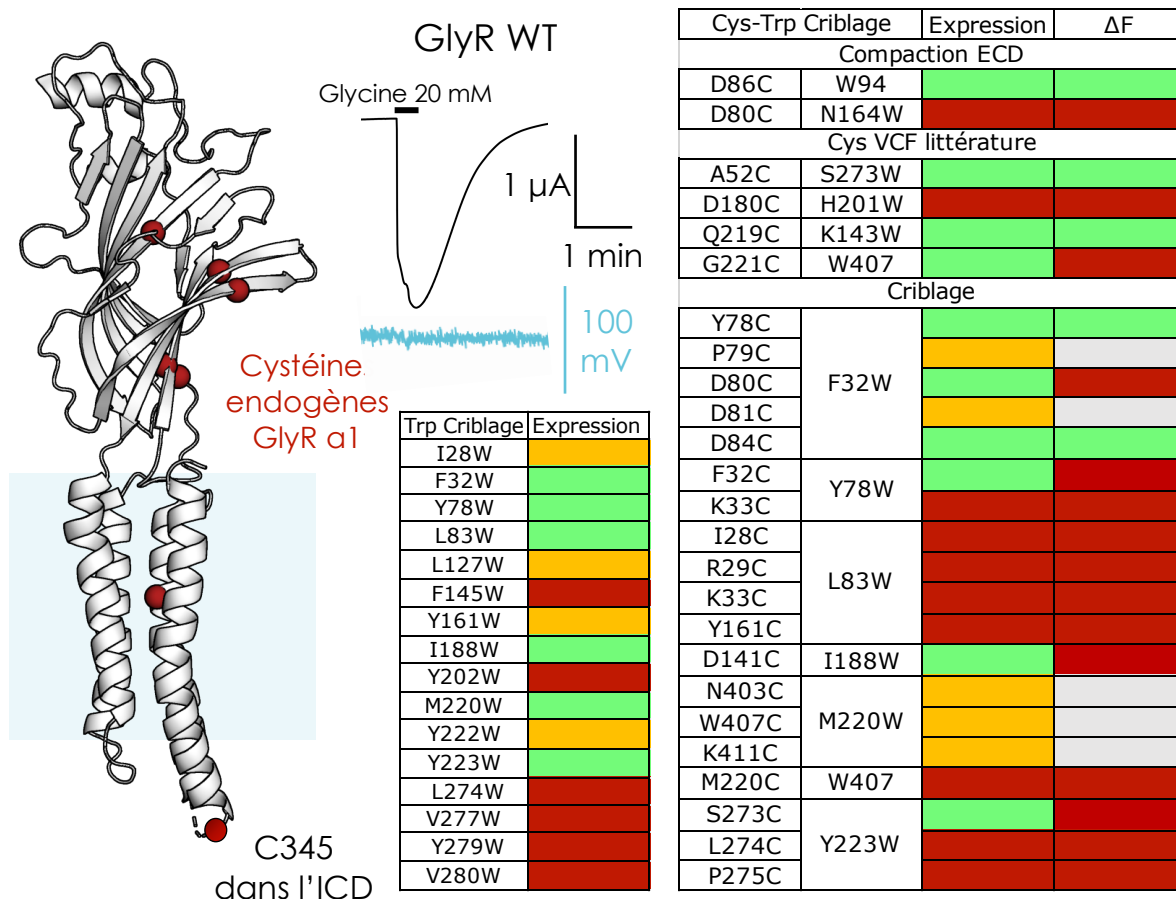


Figure 13. Cystéines endogènes et mutations de GlyR. À gauche, une sous-unité montrant les cystéines endogènes de GlyR $\alpha 1$. Tracé de VCF montrant une absence de réponse en ΔF lors d'une application de glycine sur le récepteur sauvage marqué au TAMRA indiquant l'absence de signal non spécifique provenant des cystéines endogènes. À droite, tableaux récapitulatifs des mutations testés avec les différentes stratégies. Le courant mesuré est soit comparable au sauvage à 1 mM (vert), soit inférieur (orange), ou bien aucun courant n'est mesuré (rouge). Pour les mutants Cystéine + Tryptophane ayant une fonction satisfaisante, le marquage au TAMRA, Hylite 488 ou MTSR a été testé, les mutants présentant un ΔF sont indiqués en vert.

Une première approche pour concevoir les paires Cys-Trp a été développée au début du projet lorsque l'on pensait pouvoir utiliser des paires de quenching Bodipy-Tryptophane. Elle a consisté à faire une étude comparative des structures de GLIC et celles de GlyR qui venaient d'être publiées (Du et al., 2015; X. Huang et al., 2015) afin de transposer les paires de quenching du bimane trouvées sur GLIC vers leur équivalent sur GlyR. L'une des idées derrière cette approche était de pouvoir répondre à la question de la conservation des réorganisations entre eucaryotes et procaryotes. L'étude des structures a révélé que de manière similaire à GluCl dont plusieurs conformations avaient été résolues auparavant (Althoff et al., 2014; Hibbs & Gouaux, 2011), les changements entre les différents états de

GlyR, inhibé par la strychnine et en présence d'agoniste et de potentialisateur sont d'amplitude assez faible notamment en ce qui concerne la compaction de l'ECD (un-blooming et twist). Malgré ces considérations, deux paires ont été imaginées pour observer la compaction en haut de l'ECD avec les mutants D80C-N164W et D86C-W94.

Les changements de conformations les plus notables se trouvent plutôt au niveau des boucles 2, Cys-loop et F à l'interface ECD-TMD et au niveau de la boucle C du site orthostérique. Pour maximiser les chances d'observer des ΔF dans ces régions, des paires ont aussi été conçues à partir des cystéines utilisées dans les études précédentes. Des tryptophanes ont été ajoutés dans le but d'observer des ΔF qu'il est ensuite possible d'interpréter en termes de rapprochement/éloignement des fluorophores-quencher (Figure 14). Il a été choisi de laisser de côté les positions autour du site orthostérique pour éviter d'observer l'interaction directe fluorophore-ligand. Plusieurs paires ont donné des ΔF dont une, Q219C-K143W pour laquelle la caractérisation est détaillée plus loin. Globalement, ces deux stratégies ont donné un nombre assez limité de paires Cys-Trp capables de reporter un changement de conformation, et celles pour lesquelles des ΔF obtenus présentes parfois des pertes de fonction sévères. Certaines mutations pour l'ajout du tryptophane donnent des récepteurs non fonctionnels ou qui ne s'expriment pas à la membrane. Il avait déjà été observé sur GLIC que l'ajout de tryptophane sur des parties de l'ECD trop exposées au solvant rendait la protéine moins stable et la quantité d'agrégats augmentait lors de la purification. De manière générale, il est admis que des résidus hydrophobes exposés au solvant diminuent la stabilité des protéines (Wigley et al., 1987).

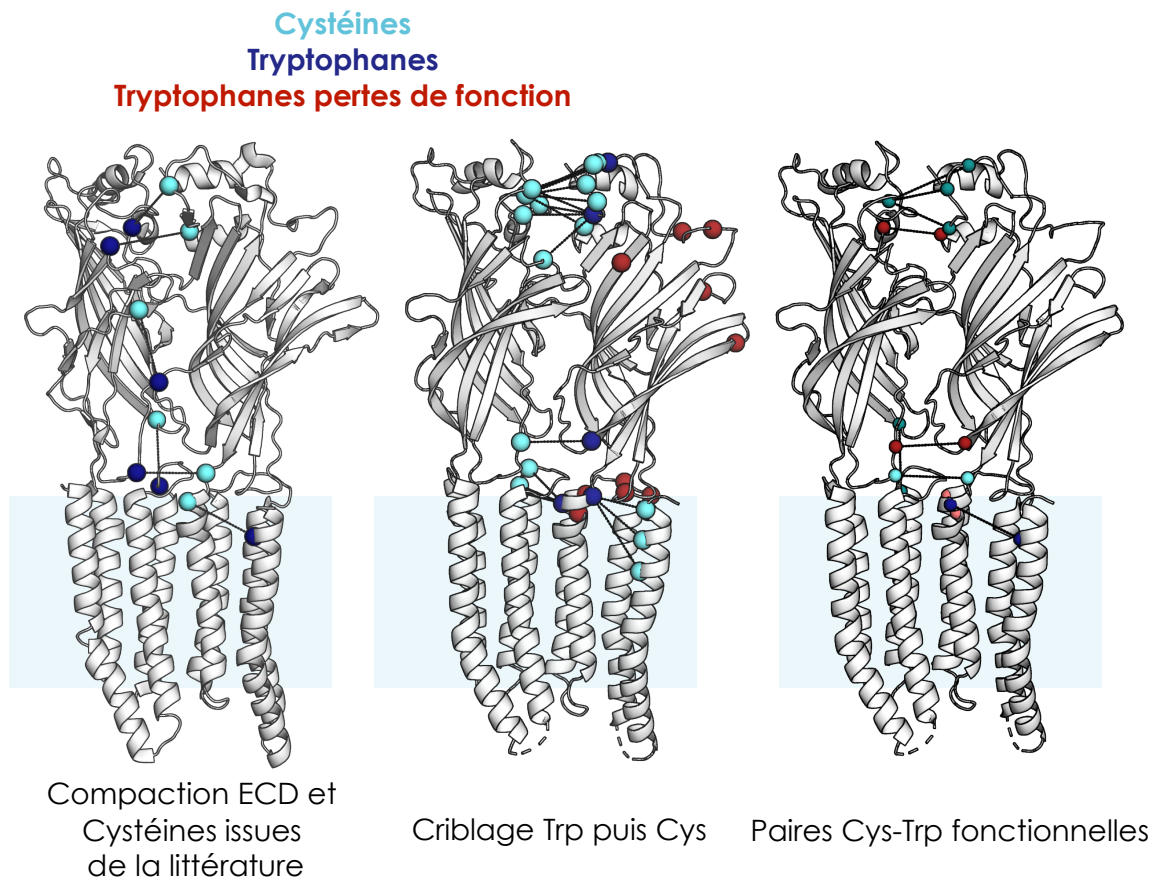


Figure 14. Positions des cystéines et tryptophanes testés dans le criblage. Structure du GlyR avec le même code couleur pour les deux figures de gauche. À droite, chaque paire de Trp-Cys est représentée par des sphères de la même couleur.

Une deuxième phase de conception de paires Cys-Trp a alors été menée en prenant en compte cette sensibilité de GlyR à l'ajout de résidus hydrophobes. Tout d'abord, les résidus hydrophobes leucine, valine, isoleucine, méthionine, tyrosine, phénylalanine et tryptophane ont été sélectionnés avec l'idée que remplacer un résidu déjà hydrophobe par un tryptophane (ou utiliser un Trp endogène) limite l'impact sur la stabilité de la protéine. Parmi ces résidus ont été gardés ceux se trouvant à une interface, dans une zone qui peut subir un changement de conformation et dont l'orientation de la chaîne latérale est favorable pour concevoir une paire avec une cystéine. Ces résidus ont été mutés en tryptophanes et leur fonction a été testé en électrophysiologie. Ceux présentant un courant d'amplitude similaire au contrôle sans tryptophane en réponse à une concentration de glycine de 1 mM ont été sélectionnés (Figure 13). 6 mutants tryptophane ont été sélectionnés et des cystéines ont été ajoutées par mutagenèse à différentes positions (entre 1 et 6 par tryptophane). Le courant et la fluorescence ont été testés après expression et marquage au TAMRA.

De même que pour l'introduction de tryptophanes, il s'est avéré que l'étape d'introduction de la cystéine a entraîné une perte de fonction dans une bonne partie des mutants. Parmi ceux qui étaient fonctionnels certains ont présenté un faible ΔF (en TAMRA ou Hylite 488) mais seulement pour des concentrations élevées en glycine et leur analyse n'a pas été poursuivie en détails. Comme évoqué précédemment, ces fluorophores sont relativement grands et il est difficile d'anticiper la position de la cystéine qui permettra d'observer un quenching. Ce criblage systématique des mutants a fourni une banque de paires cystéine-tryptophane qu'il sera intéressant d'investiguer lorsque le panel de fluorophores à disposition sera plus important.

Il est intéressant de noter que le récepteur glycine semble être beaucoup plus sensible aux mutations en comparaison avec GLIC, probablement parce que l'évolution de ce récepteur l'a doté d'un fonctionnement finement régulé qui ne tolère pas bien les modifications. Dans le futur, d'autres approches peuvent être adoptées pour concevoir ces positions de quenching. Par exemple avec l'apport des simulations en dynamique moléculaire, on pourra mettre en évidence des régions pour lesquels des réorganisations sont importantes là où une simple comparaison des structures ne mettrait pas en évidence un changement important.

Description des paires identifiées

À la suite de ce criblage, on retrouve 10 paires Cystéine-Tryptophane qui sont fonctionnelles et qui couvrent différentes interfaces du récepteur. 5 d'entre elles sont à l'interface ECD-TMD (Figure 15). Parmi ces paires, 2 sont inter sous-unité entre le pré-M1 et la Cys-loop (Q219C-K143W) et entre la boucle F et la Cys-loop (I188W-D141C). Les 3 autres, intra sous-unité, se situent entre la boucle 2 et le haut de M2 (A52C-S273W) ; entre le haut de M1 et de M4 (G221C-W407) et entre le haut de M1 et M2 (Y223W-S273C). La paire Q219C-K143W donne un ΔF robuste et sera caractérisée en détails dans la partie suivante. Avec la paire A52C S273W, on s'attend à observer du quenching d'après les structures où l'on voit la boucle 2 se rapprocher vers le centre de l'ECD et M2 remonter vers l'interface ECD-TMD. On observe bien un ΔF négatif avec application de glycine, mais celui-ci a une amplitude d'au maximum 5% en $\Delta F/F$ ce qui est similaire à ce qui a été mesuré auparavant avec la cystéine seule sans tryptophane (Pless & Lynch, 2009b). Il semble donc que le tryptophane introduit n'effectue pas de quenching sur le TAMRA à cette position, peut-être à cause de son orientation sur M2. Les trois autres positions ne donnent pas de ΔF robuste avec le TAMRA et

Il est possible que l'utilisation d'autres fluorophores puissent donner de meilleurs résultats pour étudier les mouvements à ces interfaces.

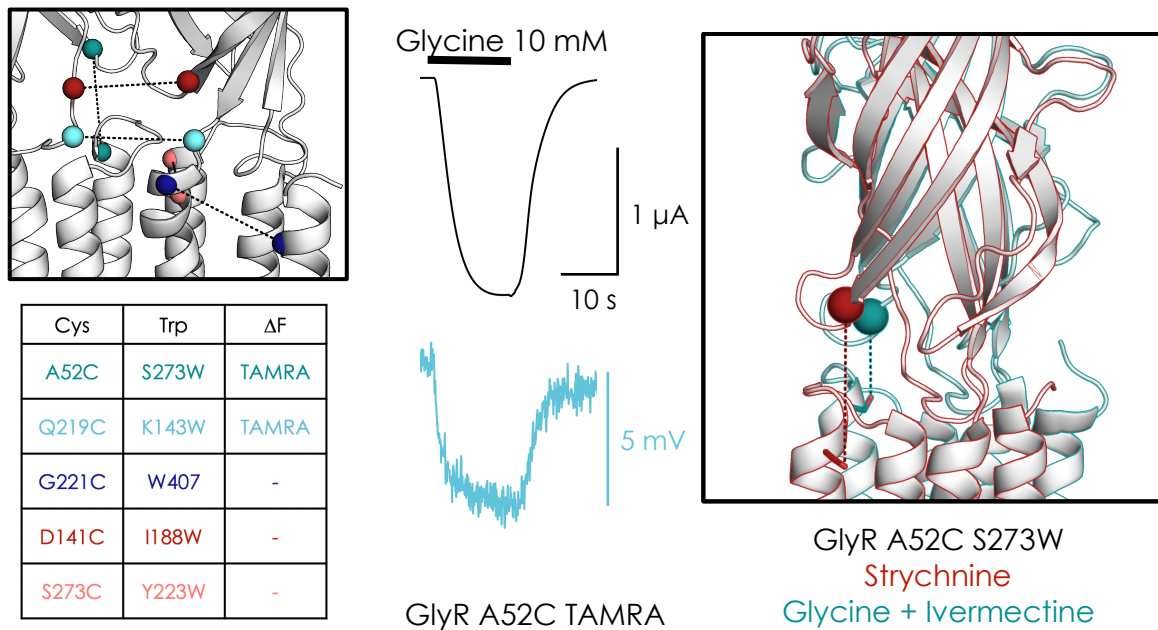


Figure 15. Paires de quenching à l'interface ECD-TMD. À gauche, tableau des paires testées et position correspondante dans la structure. Exemple de tracé obtenu pour GlyR A52C marqué au TAMRA. À droite, superposition des structures en présence de strychnine et glycine + ivermectine montrant le rapprochement de A52 et S273 lors de l'activation.

Les 5 autres paires Cys-Trp fonctionnelles se trouvent en haut de l'ECD au niveau de l'interface inter sous-unité, au-dessus du site orthostérique (Figure 16). Il est intéressant de regarder les changements de conformation à cet endroit car il correspond au site de liaison qui a été caractérisé sur GlyR $\alpha 3$ d'une nouvelle classe de potentialisateurs des récepteurs glycine, les molécules AM-1488 et AM-3607 (X. Huang et al., 2016). Sur les 5 paires, trois montrent un ΔF positif lorsqu'elles sont marquées au TAMRA (D86C-W94 et D84C-F32W) ou au Hylite 488 (Y78C-F32W). Dans les structures, la distance entre les deux positions augmente dans les trois cas donc on s'attend bien à un dé-quenching. Pour vérifier qu'il s'agit bien de l'effet du tryptophane, la mutation W94F a été testée mais donne un récepteur non fonctionnel et la présence d'un éventuel ΔF en l'absence du tryptophane F32W n'a pas été encore testée.

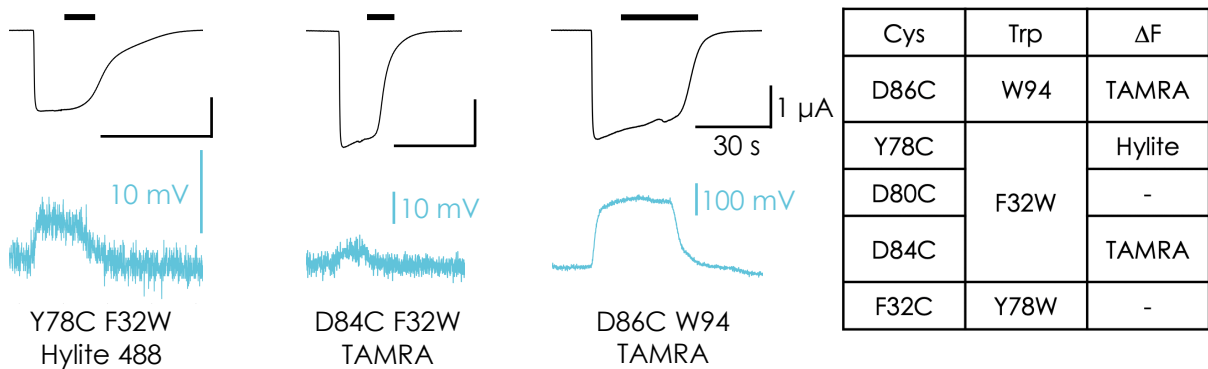
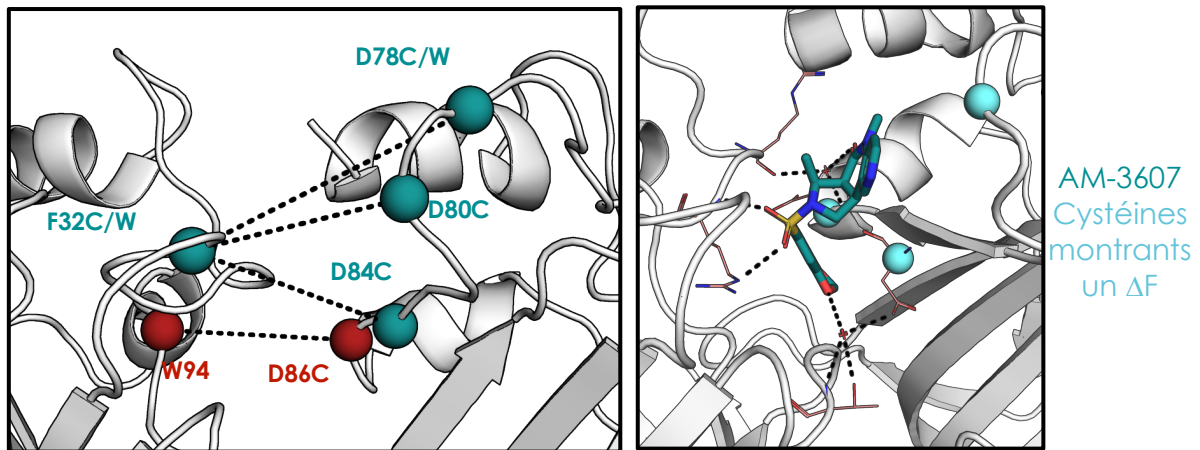


Figure 16. Paires de quenching en haut de l'ECD. Zoom sur la structure de GlyR montrant les différentes paires testées, résumées dans le tableau. En haut à droite, structure dans le haut de l'ECD du site de liaison du potentialisateur AM-3607 qui se trouve au milieu de la région regardée par les paires de quenching. En bas, exemple de tracés de VCF pour les différentes paires.

Le ΔF le plus important des 3 positions du TAMRA est en D86C et on observe un ΔF positif également avec le Hylite 488 et le MTSR (Figure 17). Une co-application de strychnine à une concentration élevée de glycine à 0.1 ou 1 mM n'a presque pas d'effet sur le courant alors que le ΔF est inhibée en grande partie. Cette observation indique que le ΔF observé est dû à un changement de conformation en aval de l'activation et qu'il ne semble pas nécessaire pour l'activation du récepteur.

On peut émettre l'hypothèse que le mouvement des interfaces en haut de l'ECD mesuré à cette position soit plus tardif que l'activation mais qu'il stabilise l'état actif. Le potentialisateur qui interagit avec les boucles en haut de l'ECD pourrait favoriser ce changement de conformation stabilisant ainsi l'état actif.

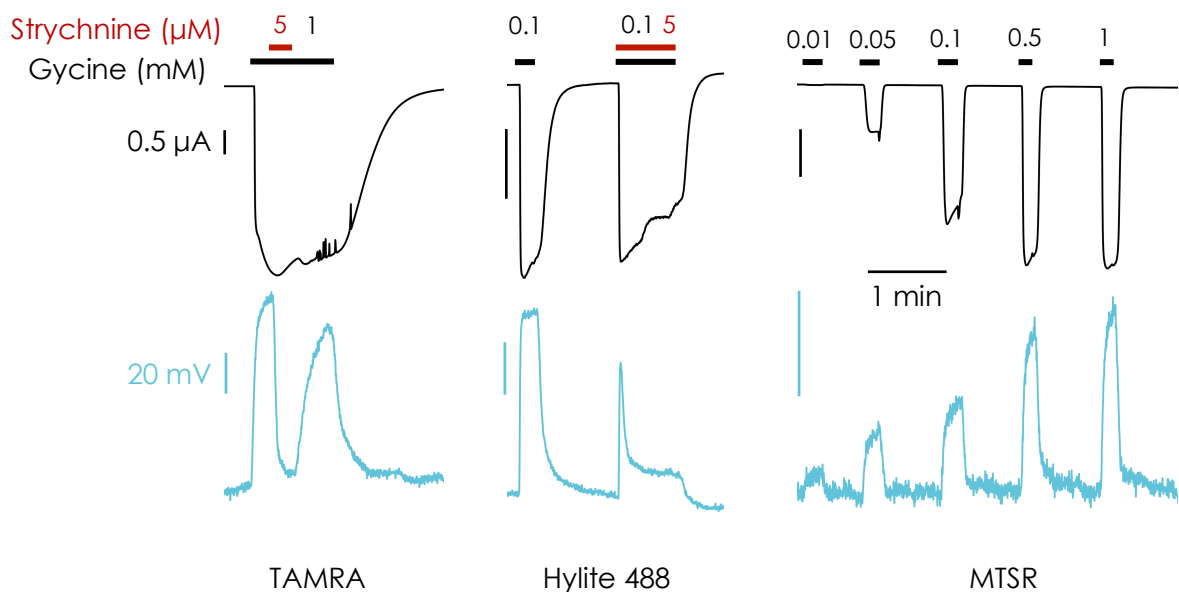


Figure 17. ΔF mesurés sur le GlyR D86C. Exemples de tracés de VCF du mutant marqué au TAMRA, Hylite 488 ou MTSR montrant un ΔF positif pour les trois fluorophores. Le marquage par le Hylite 488 entraîne un gain de fonction. Une co-application de strychnine à 5 μM avec une concentration saturante de glycine entraîne la perte du ΔF sans inhibition du courant à la fois pour le TAMRA et le Hylite 488.

Caractérisation de la paire Q219C-K143W

La paire Q219C-K143W a été conçue à partir de la position de la cystéine sur la boucle pré-M1 qui avait déjà été découverte précédemment pour rapporter un changement de conformation (Pless & Lynch, 2009b, 2009c). Pour le mutant marqué au MTSR, l'application de glycine produit une diminution de fluorescence. La courbe dose réponse est déplacée vers les plus hautes concentrations d'un ordre de grandeur par rapport à la dose-réponse du courant avec des valeurs d' EC_{50} de 98,6 et 9,2 μM respectivement. Dans notre cas, le marquage au TAMRA sur la même position Q219C donne un ΔF positif qui est également décalé vers les plus hautes concentrations, l' EC_{50} est de 184 μM contre 35,6 μM pour le courant (Figure 18). Il est intéressant de noter que le changement de fluorescence peut être différent selon la nature du fluorophore. Étant données la taille du *linker* pour ces fluorophores TAMRA et MTSR (Figure 3), il est possible que la position du fluorophore et donc son environnement local varie selon sa nature. Avec l'orientation de la glutamine 219 dans les structures, on peut regarder si des résidus à proximité peuvent expliquer le changement de fluorescence observé. La tyrosine 279 se trouve sur la boucle M2M3 et s'éloigne de 5,3 à 9,2 Å en distance $C\beta$ par rapport à Q219. Il est possible que cette tyrosine ait un rôle dans le ΔF observé pour le mutant Q219C. Lors du criblage précédent, la mutation en tryptophane de

cette tyrosine avait donné un mutant non fonctionnel. Sa mutation en alanine donne une perte de fonction importante et elle a été identifiée comme mutation hyperekplexique lorsqu'elle est mutée cystéine (Lynch et al., 1997). Dans les structures, on voit que le groupe hydroxyle de Y279 interagit avec la chaîne principale de la leucine 142 de la Cys-loop. Il est possible que cette interaction soit importante pour stabiliser l'état actif et la mutation de la tyrosine donne un récepteur non fonctionnel.

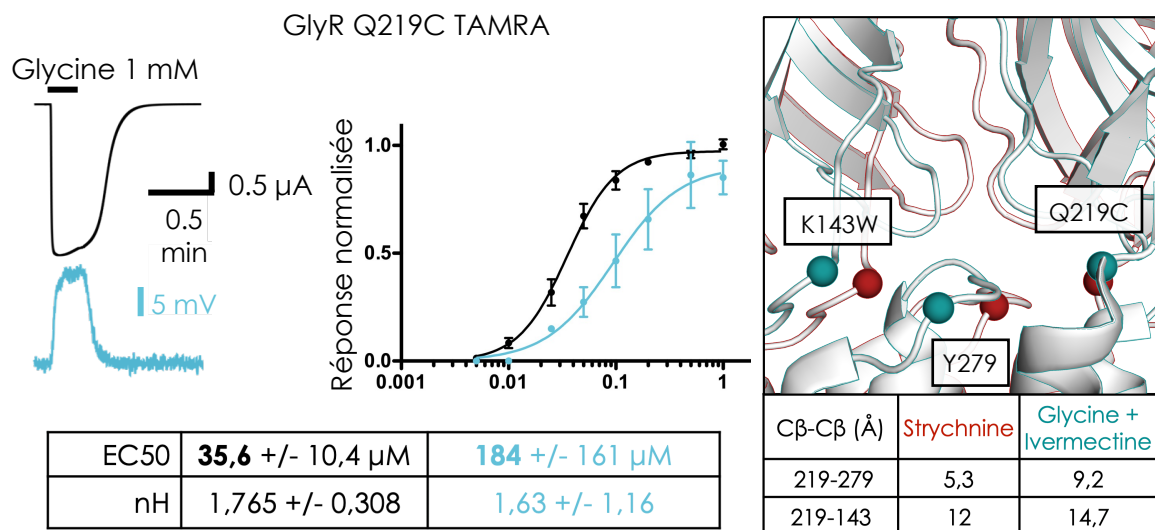


Figure 18. Caractérisation de GlyR Q219C marqué au TAMRA. Exemple de tracé obtenu à gauche et dose-réponse en fonction de la concentration en glycine. Le tableau donne les valeurs issues des analyses ($n=6$ sur 4 injections). À droite le zoom sur les structures montre l'éloignement entre les positions Q219C et K143W entre l'état inhibé par la strychnine et l'état actif en présence de glycine et ivermectine. Sur la boucle M2M3 est représentée la tyrosine 279 qui pourrait contribuer au ΔF visible dans le mutant Q219C.

La distance entre Q219 et Y279 reste faible sous les 10 Å même dans l'état actif. Il est possible qu'à cette distance, un fluorophore de la taille du TAMRA soit toujours dans la sphère de quenching de ce résidu. Une autre région dans l'environnement proche de Q219C est la Cys-loop. Tout comme la boucle M2M3, elle s'éloigne de Q219C dans la structure de l'état actif mais les distances sont plus grandes et en ciblant cette région pour ajouter un tryptophane, on espère observer un quenching du TAMRA plus facilement interprétable. Le résidu qui a la chaîne latérale la mieux orientée vers Q219 est le résidu K143. Muté en tryptophane, il donne un récepteur qui présente une perte de fonction assez importante mais qui permet néanmoins d'enregistrer un courant robuste. Lorsque ce mutant est marqué au TAMRA, il donne un ΔF négatif lors d'application de glycine indiquant un quenching et donc un rapprochement des deux positions. À l'inverse, on voit dans les structures une

augmentation de la distance Q219-K143 de 12 à 14,7 Å et on s'attendait plutôt à observer un dé-quenching avec cette paire et donc une augmentation de fluorescence. Avec les observations faites sur ce double mutant Q219C-K143W et sur le mutant simple Q219C, il est clair que du fait de la longueur du *linker* du TAMRA, il est difficile de prévoir la distance entre le fluorophore et le quencher. Néanmoins, cette paire Q219C K143W rapporte un mouvement local qu'il est intéressant d'étudier plus en détails.

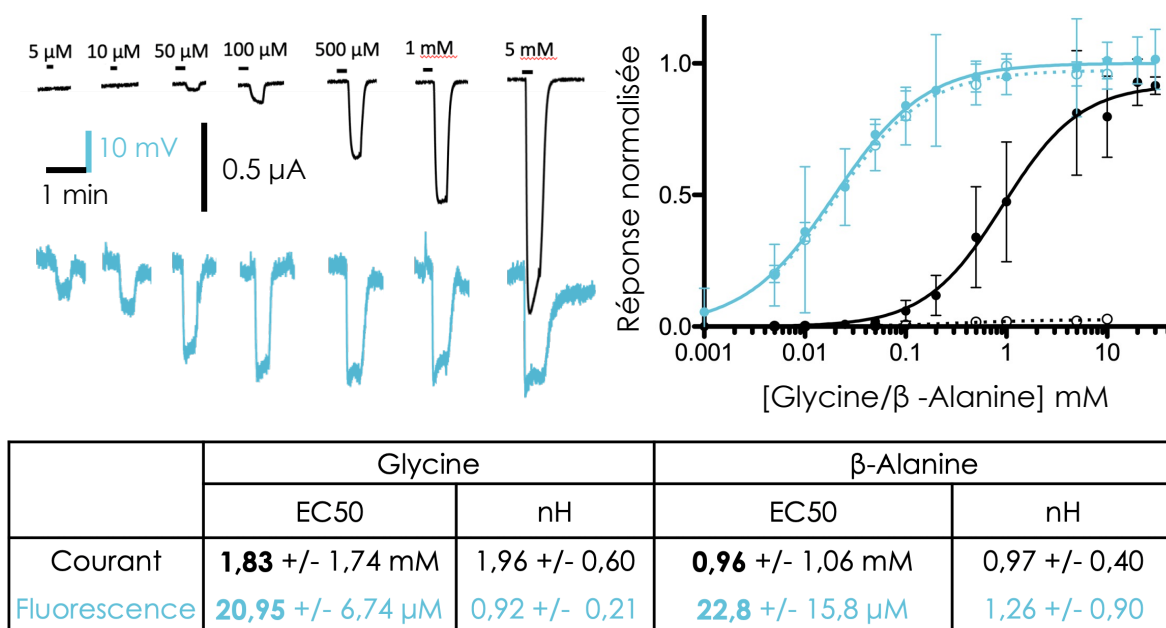


Figure 19. Caractérisation de GlyR Q219C K143W marqué au TAMRA. À gauche, exemple de réponse obtenue à différentes concentrations de glycine. On voit directement l'apparition de ΔF à des concentrations faibles en glycine qui n'entraînent pas d'apparition de courant. À droite, la dose-réponse en fonction de la concentration en glycine et en pointillés celle en fonction de la concentration en β -alanine en courant et en fluorescence. Le tableau donne les valeurs issues des analyses ($n=20$ sur 10 injections pour la glycine, $n=7$ sur 1 injection pour la β -alanine).

La paire Q219C-K143W donne un EC_{50} de 20,95 μ M pour la fluorescence et de 1,83 mM pour le courant (Figure 19). À l'inverse du mutant cystéine simple, cette fois c'est la fluorescence qui apparaît avant le courant aux faibles concentrations de glycine. L'application de l'agoniste partiel β -alanine donne un courant de très faible amplitude en comparaison avec ceux observés en présence de glycine. En revanche le ΔF observé pour l'agoniste partiel est similaire en amplitude et en dose-réponse avec la glycine.

Comme cela a été fait pour la position D86C, une concentration de strychnine de 5 μ M a été co-appliquée avec des concentrations différentes de glycine de 0,1 ; 1 et 10 mM (Figure 20). Pour le double mutant Q219C K143W, on voit de manière contraire au mutant D86C, que

pour les concentrations les plus fortes en glycine, il n'y a presque plus d'inhibition de la fluorescence alors que le courant est inhibé. Pour la co-application avec 0,1 mM de glycine, on observe que la fluorescence augmente au-dessus du niveau avant application. De la même manière l'application de strychnine seule produit une augmentation de la fluorescence au-dessus du niveau de base.

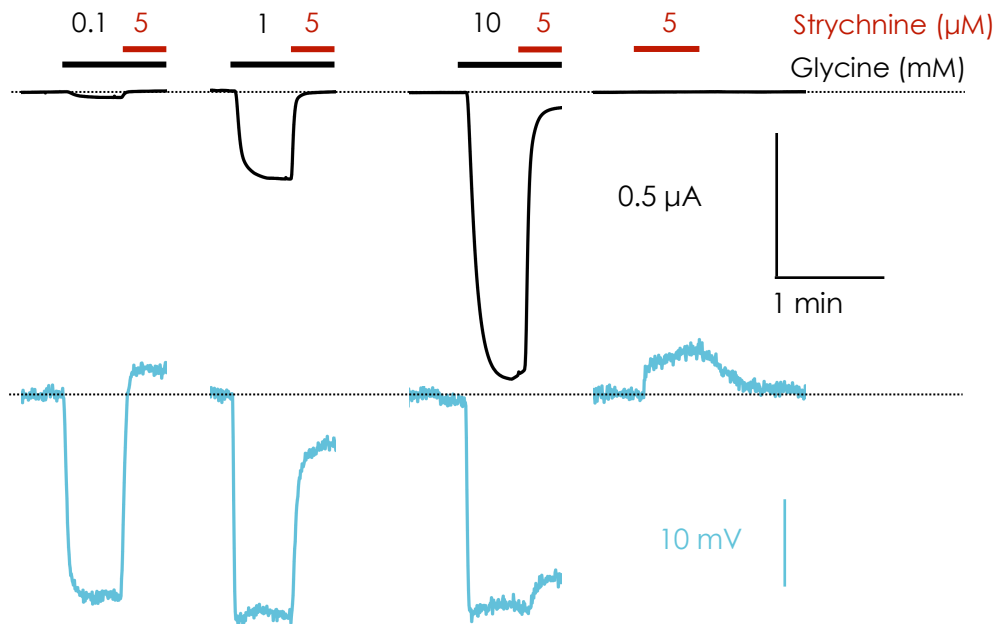


Figure 20. Sensibilité du Q219C K143W à la strychnine. Tracés de VCF avec des co-applications de strychnine avec différentes concentrations de glycine. Alors que la strychnine inhibe le courant, la fluorescence n'est presque pas inhibée avec 10 mM de glycine. La strychnine seule induit un ΔF opposé à celui en présence de glycine.

Pour ce mutant, la différence entre EC_{50} en courant et en fluorescence est de deux ordre de grandeur. Aux vues de cette différence importante, on peut se poser la question si les populations observées en courant et en fluorescence sont les mêmes. Par exemple, le marquage au TAMRA pourrait entraîner une perte de fonction des récepteurs et les populations mesurées en fluorescence et en courant seraient alors différentes. Dans ce cas, les récepteurs mesurés en fluorescence ne donneraient pas de courant et ceux mesurés en courant ne seraient pas marqués. Pour écarter cette possibilité, une expérience de marquage directement dans la chambre de perfusion a été réalisée (Figure 21). On voit qu'après 1 min de marquage à 1 μM (10 fois moins que la concentration utilisée habituellement), le signal de fluorescence a augmenté et le ΔF commence à apparaître avec l'application de glycine 1 mM. L'amplitude des courants est légèrement supérieure après réaction du TAMRA indiquant que le marquage donne un gain de fonction au récepteur à cette position. Il existe donc bien une

population de récepteurs que l'on mesure à la fois en courant et fluorescence, même si on ne peut pas exclure qu'une partie des récepteurs mesurés par électrophysiologie ne sont pas marqués.

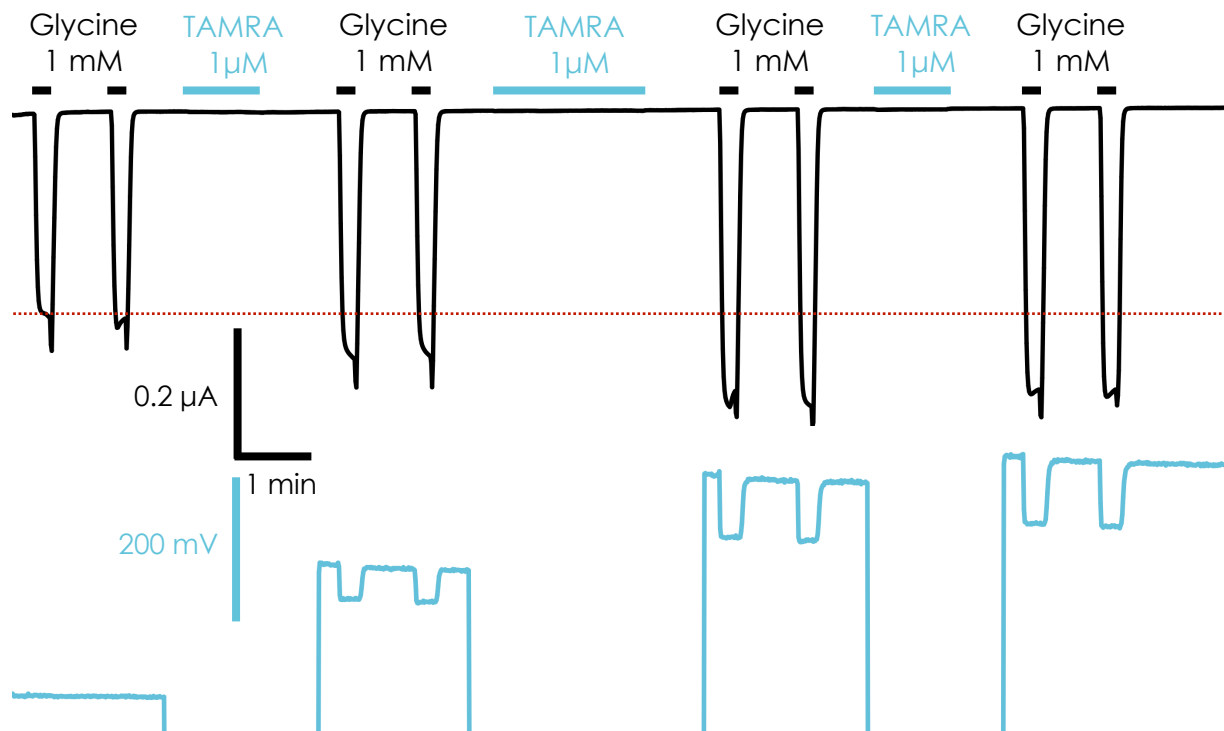


Figure 21. Marquage pendant l'enregistrement de VCF. Un ovocyte exprimant GlyR Q219C K143W est enregistré en VCF, les deux premières applications correspondent au récepteur non marqué, puis on observe l'augmentation du niveau de fluorescence et l'apparition du ΔF obtenu par l'application de glycine au fur et à mesure des périodes de marquage. La LED est éteinte pendant le marquage pour ne pas saturer le détecteur.

Si l'on observe la même population de récepteurs en courant et en fluorescence, deux hypothèses sur la nature de la réorganisation observée peuvent expliquer le décalage mesuré entre la courbe dose-réponse de courant et de fluorescence. La première serait que le ΔF mesuré correspond à un mouvement qui se produit en amont de l'activation, et donc que l' EC_{50} en fluorescence serait plus faible que celui du courant. La deuxième hypothèse serait que le mouvement observé a lieu pendant la désensibilisation. L'affinité pour la glycine de l'état désensibilisé étant plus haute que celle de l'état actif, il est possible d'observer un décalage de l' EC_{50} de fluorescence vers des concentrations plus basses. En revanche, l'état désensibilisé apparaît plus lentement que l'état actif, et dans ce cas on s'attend à une cinétique plus lente du ΔF par rapport à l'apparition de courant. C'est ce qui est observé dans le cas du mutant Q219C marqué au MTSR, la cinétique de fluorescence est plus lente et lorsqu'une mutation augmentant la désensibilisation est ajoutée, on observe une

augmentation de la cinétique de l'apparition du ΔF (Q. Wang & Lynch, 2011). Dans notre cas, la cinétique d'apparition du ΔF est beaucoup plus rapide que celle du courant pour le mutant Q219C K143W (Figure 22). Comme cela a été décrit pour le 5-HT₃R, la vitesse de perfusion est un aspect limitant de notre système pour observer les cinétiques du ΔF et de l'apparition de courant. L'application d'agoniste n'est pas instantanée mais est plutôt sous la forme d'un gradient et la concentration maximale est atteinte en environ 7 secondes. On peut imaginer qu'à une concentration en agoniste saturante, l'effet de la perfusion sur la concentration apparente est moindre. À 30 mM de glycine, on observe toujours une cinétique beaucoup plus rapide du ΔF par rapport au courant.

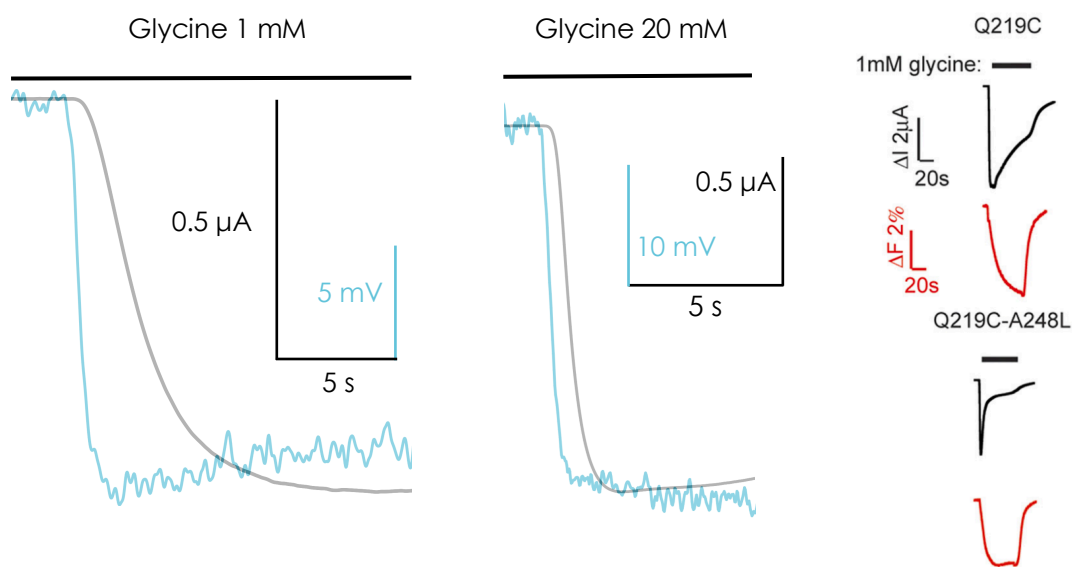


Figure 22. Cinétique d'apparition du courant et de la fluorescence du TAMRA et le MSTR sur GlyR en Q219C. Zoom sur les premières secondes d'application de glycine à 1 mM et 20 mM. En utilisant une concentration saturante de 20 mM, on limite l'effet gradient de concentration pendant l'application. La fluorescence apparaît toujours plus rapidement que le courant et indique que le ΔF n'est pas lié à la désensibilisation. À droite, le mutant Q219C marqué au MSTR suit une réorganisation liée à la désensibilisation et sa cinétique d'apparition du ΔF est plus lente que l'activation, en revanche elle est accélérée par la mutation A248L favorisant la désensibilisation (Q. Wang & Lynch, 2011).

Aux vues de ces observations, nous proposons un modèle interprétatif basé sur la première hypothèse (Figure 23). Dans ce modèle, les ΔF observés pour ce mutant Q219C K143W mesurent une réorganisation qui aurait lieu à un stade précoce de l'activation. Comme ce changement de fluorescence est similaire lors d'une activation par la glycine et par le β -alanine, alors on en déduit que les réorganisations mesurées seraient antérieures aux réorganisations de l'état *flipped*. En effet, dans les études cinétiques qui ont permis la

caractérisation d'un état pré-actif flip chez les RCPs (cf. introduction), l'une des caractéristiques majeures était que cet état était beaucoup moins favorisé par les agonistes partiels par rapport aux agonistes totaux (Lape et al., 2008). Cette différence est l'argument principal pour expliquer la différence de réponse des récepteurs aux agonistes partiels. L'état intermédiaire *flipped* est un état pour lequel la majorité des réorganisations aurait eu lieu et il resterait ensuite l'ouverture du canal pour obtenir l'état actif. De par la grande différence entre l' EC_{50} de courant et de fluorescence et l'effet similaire des agonistes partiels et totaux, les changements de conformation en amont de l'activation observés sur ce mutant de GlyR ne correspondent pas aux caractéristiques de l'état *flipped*. Les changements de conformation observés ici indiquent plutôt un état intermédiaire beaucoup plus précoce sur le chemin d'activation.

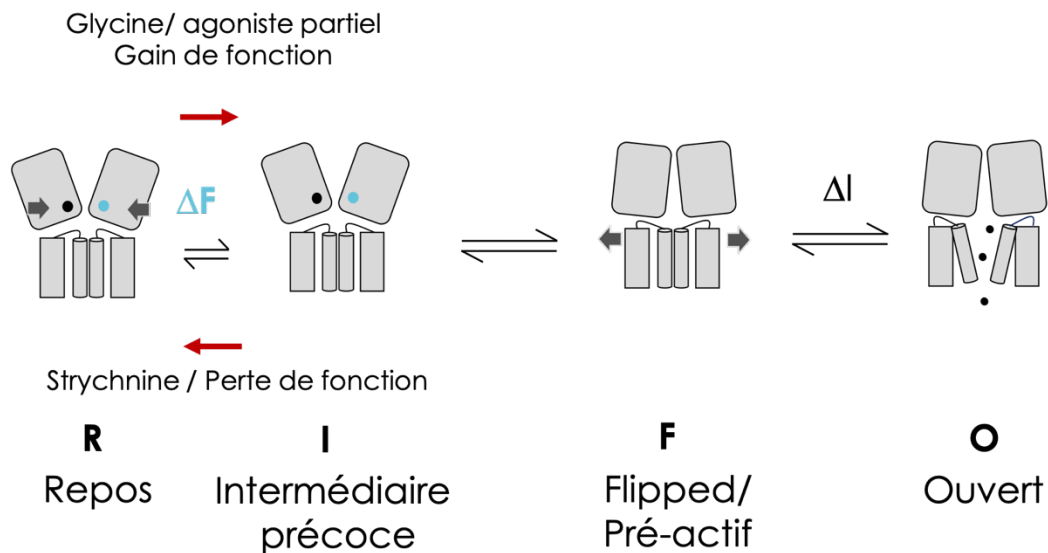


Figure 23. Modèle pour l'interprétation des réorganisations observées en VCF sur le GlyR Q219C K143W marqué au TAMRA.

Deux interprétations peuvent expliquer les observations faites en présence d'antagoniste compétitif. La strychnine peut stabiliser un état inhibé différent de l'état Apo en absence de ligand pour lequel le changement de conformation va à l'opposé de celui mesuré lors de l'activation. La deuxième possibilité est qu'en l'absence de ligand, le récepteur soit déjà dans un équilibre entre l'état de repos et l'état intermédiaire précoce pour lequel le mouvement observé entre 219 et 143 a eu lieu. Dans cette hypothèse la strychnine déplacerait la population de récepteurs dans l'état de repos. Une manière de concilier ces deux interprétations serait de penser l'état au repos en termes de paysage conformationnel. Dans ce paysage une des conformations est stabilisée par la strychnine et il existerait une

conformation de l'état de repos pour laquelle le mouvement de la Cys-loop a eu lieu. Cette conformation serait sur le chemin conformationnel vers l'état actif ce qui expliquerait qu'elle soit visible en fluorescence à des concentrations très faibles de glycine.

Mutations

Comme cela été vu dans la partie précédente, certaines mutations étudiées sur GLIC ont des positions homologues à des mutations chez les RCPs humains qui sont pathologiques. L'extension des observations faites sur GLIC aux RCPs humains peut être informative mais il est intéressant d'observer directement l'effet des mutations pathologiques sur les réorganisations des GlyR par VCF. C'est ce qui a été réalisé dans la dernière partie de ce projet avec la position qui a été caractérisée : Q219C-K143W. Parmi les nombreuses mutations pathologiques qui ont été décrites dans la littérature deux d'entre elles, causant l'hyperekplexie ont été testées. La première, R271Q entraîne une perte de fonction sévère avec une diminution de la conductance en canal-unique et une baisse de la puissance et de l'efficacité de la glycine. R271 se trouve au niveau du haut de M2 orienté vers l'intérieur du TMD avec des interactions avec les hélices M3-intra et M2 et M3 inter sous-unité. La deuxième mutation pathologique étudiée, V280M a été caractérisée comme un gain de fonction et présente une activité constitutive en absence de glycine. Elle se trouve sur la fin de la boucle M2M3, et fait face à la membrane (Bode & Lynch, 2014; Moraga-Cid et al., 2015).

Un autre aspect intéressant à regarder sur les RCPs eucaryotes qui n'a pas été développé sur GLIC est la désensibilisation. Certaines mutations sur les récepteurs GABA_AR et GlyR ont montré une augmentation de la désensibilisation (Gielen et al., 2015) et la mutation N305V en bas de M3 a été choisie pour regarder l'effet de la désensibilisation sur les réorganisations étudiées par VCF.

Les mutations du GlyR Q219C et surtout K143W ont déjà un effet important sur la fonction. L'addition de la mutation de désensibilisation N305V sur cette double mutation donne une perturbation très prononcée de la fonction. Pour ces mutants, on n'observe pas de courant lors des applications de glycine. En revanche un ΔF robuste est observé et la courbe dose réponse a été mesurée (Figure 24). Elle donne un EC_{50} similaire pour le mutant désensibilisation. Une interprétation possible est que la mutation N305V stabilise directement les récepteurs dans l'état désensibilisé pour lequel la conformation de la Cys-loop et donc le ΔF observé sont les mêmes que pour l'état intermédiaire d'activation et l'état actif. Les

observations faites pour ce mutant désensibilisation sont en accord avec le modèle proposé d'un état précoce de l'activation qui est observé par les ΔF mesurés par la paire Q219C K143W. Dans l'hypothèse où cette paire mesurerait les réorganisations liées à la désensibilisation, on se serait attendu à favoriser encore d'avantage la transition mesurée en fluorescence. Or on ne voit pas de décalage de la courbe dose réponse de fluorescence vers les plus faibles concentrations, elle est même légèrement décalée dans l'autre sens.

Pour la mutation perte de fonction R271Q, de manière similaire à la mutation désensibilisation, on ne mesure pas de courant en réponse à la glycine, en revanche un ΔF est mesurable. La courbe dose-réponse de ce changement de fluorescence donne un décalage vers les plus hautes concentrations de glycine. L'absence de courant indique que la mutation R271Q a donc un effet sur l'activation et le décalage de la courbe dose-réponse en fluorescence suggère que le mutant R271Q stabilise l'état de repos et défavorise la transition précoce de l'activation mesurée par la fluorescence.

En ce qui concerne la mutation gain de fonction V280M, on observe un courant robuste évoqué par la glycine mais une absence de changement de fluorescence. La courbe dose réponse de courant est décalée cette fois vers les concentrations plus faibles de glycine, et un courant constitutif en absence de glycine est parfois observé. Il est possible que dans ce mutant, le gain de fonction déplace l'équilibre de l'état de repos vers un état intermédiaire d'activation pour lequel la transition mesurée en fluorescence a déjà eu lieu même en absence de glycine. Cette mutation sur la boucle M2M3 est proche de la paire de fluorophore-quencher et on ne peut pas exclure que cette mutation ait un effet direct sur le quenching observé.

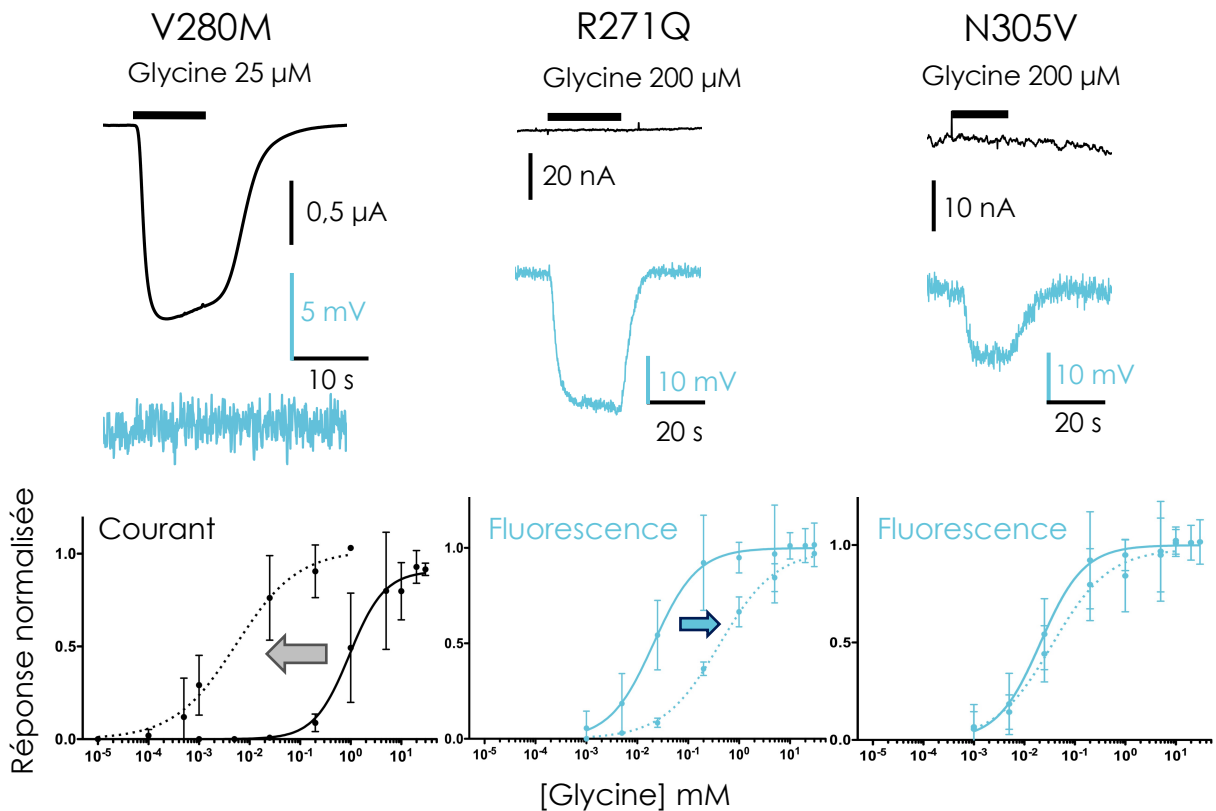


Figure 24. Effet des mutations sur la fluorescence de GlyR Q219C K143W. Courbes dose-réponse en courant ou fluorescence de Q219C K143W sans mutation (trait plein) et avec ajout d'une mutation (pointillés). Un enregistrement représentatif est montré pour chaque mutation : gain de fonction V280M ; perte de fonction R271Q et désensibilisation N305V.

Discussion

Dans ce projet, une installation de voltage-clamp fluorométrie a pu être mise au point pour suivre les réorganisations des RCPs eucaryotes. Des améliorations pourraient encore être apportées notamment : l'automatisation et/ou l'augmentation du débit du système de perfusion ; l'aménagement d'une nouvelle chambre de perfusion qui permet d'enregistrer la totalité de l'ovocyte ce qui peut être utile dans le cas de récepteurs avec une faible expression ; et enfin l'installation d'un filtre digital qui est souvent utilisé sur les postes de VCF pour améliorer le signal de fluorescence. Le poste qui a été développé a pu être validé par la reproduction de données de la littérature et a été utilisé pour enregistrer les récepteurs 5-HT₃R A de souris et GlyR α 1 humain.

Dans le cas du récepteur à la sérotonine, il a pu être montré que la réorganisation du haut de l'hélice M2 était associée à la pré-activation du récepteur et non à sa désensibilisation. Ces données ont pu conforter l'assignement d'une structure obtenue en Cryo-EM à un état

intermédiaire de l'activation. Pour le récepteur à la glycine, un criblage extensif a été réalisé pour déterminer des paires Cys-Trp qui permettent de rapporter des réorganisations à l'aide de l'approche de quenching de la fluorescence par le tryptophane.

Le principal inconvénient de la VCF est la difficulté d'interpréter les changements de fluorescence et de les assigner à des réorganisations précises. Pour contourner cette limitation, deux approches ont été prises, l'utilisation de nouveaux fluorophores et le développement du quenching par le tryptophane qui n'avait alors pas été utilisé pour l'étude des RCPs. Différents fluorophores ont pu être testés et il semble qu'à l'heure actuelle, le fluorophore idéal pour les approches de quenching en VCF n'ait pas encore été trouvé. Ceux utilisés actuellement sont souvent trop grand pour concevoir de manière précise des paires de quenching et il n'est pas rare de retrouver des ΔF contraires aux prédictions structurales selon la nature de la sonde. Les fluorophores plus petits utilisés en protéine purifiée comme le bimane ne sont pas assez brillants pour être utilisés en VCF. Le candidat idéal serait le Bodipy qui est pour l'instant trop hydrophobe pour marquer spécifiquement les récepteurs à la surface mais pourrait être modifié chimiquement pour l'usage en VCF.

Un deuxième inconvénient de la VCF concerne les positions accessibles au marquage. En effet pour que le fluorophore puisse réagir sur la cystéine elle doit être accessible ce qui empêche l'étude des domaines transmembranaire/intracellulaire et des parties non exposées de l'ECD. Pour éviter cette contrainte il est possible d'encoder génétiquement le fluorophore comme cela a été fait avec l'ANAP sur GlyR ce qui élargirait les régions d'investigation (Soh et al., 2017). Cette approche pourra être utilisée pour étudier la transition entre l'état actif et désensibilisé pour laquelle la région du TMD est surtout impactée au niveau du twist quaternaire. On peut même imaginer une combinaison avec les acides aminés non naturels fluorescents et le marquage classique sur cystéines pour regarder simultanément deux régions distinctes de la protéine. Une telle approche de VCF à deux couleurs a été utilisée dans une étude récente sur les canaux potassium voltage dépendants shaker et permet de mesurer la cinétique des réorganisations et l'indépendance des différents domaines (Kalstrup & Blunck, 2018).

Une des stratégies pour trouver les paires de quenching a été d'effectuer un criblage systématique pour trouver des positions pour lesquels le récepteur tolère bien la mutation en tryptophane. De nombreux mutants se sont avérés non fonctionnels et on peut se demander si cela vient du GlyR $\alpha 1$ en particulier ou bien si cette sensibilité est une règle générale des

RCPs humains. Si les récepteurs eucaryotes des autres espèces sont plus résistants aux mutations, il serait alors possible d'effectuer un premier criblage plus efficace sur ces récepteurs d'espèces différentes. Compte tenu de l'homologie importante de structure, les mécanismes étudiés pourront probablement être étendus aux RCPs humains.

Pour compléter les mesures de VCF et argumenter l'interprétation, il est important de développer des approches complémentaires par exemple des analyses en modélisation moléculaire. Une étude récente a montré qu'il était possible d'établir une interprétation rationnelle des ΔF observés avec des tryptophanes placés à une distance croissante (Pantazis et al., 2018). Cela a été possible sur les hélices d'un canal voltage dépendant BK. Dans notre cas, une bonne partie des positions étudiées sont sur des boucles flexibles du GlyR, il est possible que le choix de la position des Trp-Cys sur des parties plus rigides de la protéine comme des hélices ou des feuillets β aide à mieux contrôler les variations de distance et donc facilite l'interprétation des ΔF . Dans l'étude de la dépendance à la distance du quenching, différents dérivés de rhodamine ont été utilisés, dont certains avec des *linkers* plus petits ou ancrés à différents endroits sur le fluorophore, leur conférant une dépendance à la distance avec le tryptophane plus facile à anticiper. Il serait intéressant de cribler les positions conçues sur GlyR avec de tels fluorophores pour espérer observer d'autres réorganisations.

Une partie des observations de ΔF sur la paire Q219C-K143W soulèvent des questions sur les interprétations possibles des résultats. Tout d'abord il sera intéressant de comprendre la raison du décalage de la courbe dose de fluorescence d'un côté ou de l'autre par rapport à celle du courant. Un ΔF à des concentrations plus faible en agoniste que le courant pourrait être engendré par un phénomène en amont de l'activation et un ΔF décalé vers les plus hautes concentrations par un changement de conformation subséquent à l'activation. Il est possible qu'un décalage vers les plus hautes concentrations en agoniste soit produit par une asymétrie transitoire des pentamères, à des concentrations d'agoniste où suffisamment de sites sont occupés pour obtenir l'activation mais des réorganisations peuvent avoir lieu jusqu'à ce que tous les sites soient occupés. Les changements de conformations subséquent à l'activation peuvent aussi être liés à la désensibilisation et cette possibilité peut être testée relativement facilement avec des mutations qui accélèrent la désensibilisation.

Les positions de fluorophores testés pour lesquels le ΔF apparaît à des concentrations plus faibles en agoniste par rapport à l'apparition de courant sont assez rares dans l'étude des RCPs. On trouve deux études sur le site orthostérique du récepteur nicotinique hétéromérique

$\alpha 4\beta 4$ (Mouroto et al., 2008) et sur la position $\beta 19'$ du nicotinique musculaire (D. S. Dahan et al., 2004). Dans ces études, la différence d' EC_{50} peut s'expliquer par une asymétrie due au caractère hétéromérique de ces récepteurs. Sur le récepteur glycine, un tel exemple est observé lorsque le fluorophore MTSR est marqué sur la position G181C dans la boucle F en présence de la mutation A248L augmentant la désensibilisation (Q. Wang & Lynch, 2011). Dans notre cas, le mutant Q219C K143W présente la particularité d'avoir une perte de fonction importante. On peut se demander si l'écart entre les réorganisations et le courant est aussi important pour le récepteur sauvage. Pour cela, il est important de trouver des paires de quenching qui ont une fonction proche du récepteur sauvage afin d'affecter les transitions le moins possible. Néanmoins, ce mutant a l'avantage de donner des effets très marqués en courant et en fluorescence pour les trois mutants pathologiques testés. Il permet une première appréhension des effets structuraux entraînés par les mutations. Les mutations perte et gain de fonction ont toutes les deux un effet sur la réorganisation observée en amont de l'activation alors que celle-ci ne semble pas être affectée par la mutation augmentant la désensibilisation. À l'image de l'effet de certaines mutations de GLIC qui affectent l'état de repos, l'application de strychnine seule sur le récepteur glycine semble indiquer des réorganisations de l'état de repos vers un état inhibé. Dans le futur, la suite de cette étude par VCF de GlyR avec d'autres fluorophores et positions testées pourra approfondir la compréhension de ces réorganisations et de leur place dans le chemin conformationnel d'activation de ce récepteur.

DISCUSSION

Discussion Générale

Dans ce travail de thèse, plusieurs approches utilisant la fluorescence ont été développées pour l'étude des réorganisations des RCPs procaryotes et eucaryotes : Le T-jump couplé à la fluorescence a rendu possible la mesure de la cinétique de pré-activation de GLIC ; les mesures de fluorescence à l'équilibre sur des mutants allostériques de GLIC ont permis d'approfondir la compréhension de l'impact fonctionnel des mutants et modulateurs sur les transitions allostériques; et enfin, le développement de l'approche de la voltage-clamp fluorométrie fourni un outils pour l'étude par fluorescence des réorganisations des RCPs eucaryotes.

Par son aspect versatile, la fluorescence se révèle être une technique de choix pour étudier le fonctionnement des RCPs. La rapidité de ce phénomène permet son utilisation pour l'étude de cinétiques de l'ordre de la microseconde et la diversité de ses applications rend possible son utilisation sur des nombreux systèmes biologiques, du plus contrôlé avec le récepteur purifié en solution, au plus physiologique avec le récepteur exprimé à la membrane d'une cellule. Le développement technologique constant des outils fluorescents permet par exemple de pouvoir étudier plus en détail les parties des récepteurs non accessibles par marquage avec des fluorophores encodés génétiquement ou encore de développer de nouvelles sondes adaptées à l'utilisation en VCF. Certaines propriétés des fluorophores pourront être exploitées dans le futur pour approfondir les analyses qui sont faites dans le travail présenté ici sur des populations de récepteurs. La mesure du temps de vie de fluorescence permettrait de définir des sous-populations, ayant des propriétés différentes et les approches en molécule unique donneraient accès à un autre niveau de détail.

Avec l'utilisation d'une méthode de mesure par relaxation, le T-jump, il a été possible de dépasser les limites des mesures cinétiques basées sur une application rapide d'agoniste, qui atteignent dans le meilleur des cas la centaine de microsecondes en patch clamp. Avec la technique du T-jump, caractérisée par une résolution temporelle de l'ordre de la microseconde, des constantes de temps de l'ordre de 350 μ s et 3 ms ont pu être mesurées et représentent les cinétiques de réorganisation de la boucle M2M3 à l'interface ECD/TMD de GLIC. Ces cinétiques de relaxation sont inhibées par le propofol et sont donc spécifiques des

cinétiques de pré-activation du récepteur. Ces observations confirment la différence temporelle entre les phénomènes de pré-activation et d'activation et ouvrent un certain nombre de perspectives.

Tout d'abord, la complexité de la relaxation mesurée comprenant des multiples composantes exponentielles était inattendue. Du fait du système biologique sélectionné pour cette étude, avec des récepteurs reconstitués en membranes lipidiques composée d'un mélange PEPG, on peut imaginer que les phénomènes liés à l'interaction protéine-lipides complexifient la relaxation. Il serait alors intéressant de comparer les cinétiques de pré-activation en présence de différentes compositions lipidiques qui pourraient influencer les transitions. Cette étude peut être d'autant plus intéressante sur les RCPs eucaryotes qui sont connus pour être modulés de manière importante par la composition lipidique (Laverty et al., 2019; Nievas, Barrantes, & Antollini, 2008).

De plus, la nature oligomérique de la protéine peut également contribuer à la complexité des phénomènes de relaxation. GLIC est activé par les protons et les données de mutagenèse suggèrent que les senseurs au proton de GLIC ne sont pas localisés en un site unique. Ils seraient en fait multiples et répartis sur plusieurs résidus clé, notamment à l'interface ECD/TMD (Nemecz et al., 2017). Une origine possible du nombre de composantes de relaxation est donc la multiplicité des sites d'activation des protons. Il serait alors intéressant de pouvoir comparer la relaxation de GLIC avec celle d'un RCPs activé par un ligand, bien que d'autres propriétés comme l'affinité pour le ligand puissent être modifiées par la température.

La cinétique de pré-activation de GLIC mesurée en T-jump pose aussi la question de l'évolution de la fonction des RCPs entre les récepteurs procaryotes et eucaryotes, ces derniers possédant une cinétique d'activation sub-milliseconde qui permet la transmission synaptique rapide. La pré-activation sur GLIC impliquant la réorganisation de la majorité de l'ECD et des interfaces ECD-TMD, il est probable que l'étape limitante de la cinétique d'activation lente de GLIC (centaine de millisecondes) concerne les réorganisations du TMD. Il serait intéressant d'étudier ces changements conformationnels par des approches de modélisation moléculaire ou expérimentales (par l'incorporation génétique de sonde fluorescence par exemple), afin d'identifier la localisation des barrières énergétiques impliquées dans les transitions de pré-activation et d'activation. Le mouvement des hélices M2, la réorientation des chaînes latérales qui ouvrent le canal ou encore l'hydratation de ce

dernier sont des pistes possibles pour comprendre l'étape cinétique limitante de l'activation. Il serait également intéressant de détailler l'évolution du domaine transmembranaire entre les procaryotes et les eucaryotes et d'étudier les différences de cinétiques de récepteurs chimères qui pourraient nous informer sur les déterminants de la cinétique des différents types de RCPs.

Les études de fluorescence à l'équilibre de GLIC en détergent ont permis la compréhension de impacts des mutations. Les mutations perte de fonction partielle et le modulateur propofol montrent un effet longue distance entre les mutations/modulateur et le senseur fluorescent de la conformation qui sont situés dans des régions distinctes de la protéine. Cette observation est cohérente avec le caractère allostérique des RCPs et précise au niveau structural le phénomène de couplage qui a été prédit par le modèle MWC. Les mutations perte de fonction totale perturbent en profondeur ces mécanismes de couplage et mettent en évidence une perte d'efficacité dans la coordination des réorganisations pour atteindre un état actif. Dans le cas du mutant H235F, c'est le mouvement de la boucle M2M3 qui est affecté alors que la compaction de l'ECD est observée avec l'augmentation de la concentration en protons. En revanche, pour les mutants L157A et L246A, c'est la compaction de l'ECD qui est affectée alors que le mouvement de la boucle M2M3 se produit avec le changement de pH. Dans certaines études l'hypothèse a été faite que l'activation des RCPs se ferait via une vague conformationnelle qui partirait d'un point précis, comme le senseur du proton, et se propagerait ensuite sur le reste de la protéine (Grosman et al., 2000). Les résultats obtenus ici montrent que si une telle vague existe, elle n'est pas observée pour ces mutants pour lesquels les mouvements se font de manière indépendante et non séquentielle. Il est alors possible que l'activation de GLIC soit le résultat d'une synergie entre les différents domaines de la protéine qui sont fortement dépendants les uns des autres. L'étude des mutants de l'ECD à l'interface entre sous-unités montre des perturbations inattendues de l'état de repos et documente l'importance de cette région dans le contrôle de l'espacement inter-sous-unité. Comme cela a été vu dans l'étude des transitions dans l'introduction, les réorganisations du haut de l'ECD de GLIC sont de plus grandes amplitudes que celles de la partie basse de l'ECD à l'interface avec le TMD. Nos données suggèrent que des perturbations mineures locales dans la partie basse de l'ECD ont en effet un impact beaucoup plus important sur le haut de l'ECD par un effet de levier.

Les études de VCF des RCPs 5-HT_{3A} de souris ont permis la caractérisation structurale d'intermédiaires de l'activation. Parmi les structures du 5-HT_{3A} résolues par microscopie électronique, il semble que la structure présentant un canal fermé en présence de sérotonine représente un état intermédiaire en amont de l'activation. En effet dans cette structure la réorganisation du haut de M2 n'a pas encore eu lieu et les expériences en électrophysiologie écartent l'hypothèse d'un état désensibilisé. Dans cette structure les réorganisations dans l'ECD avec le *capping* de la boucle C, et les mouvements des boucles 2,F et Cys-loop et du segment pré-M1 ont eu lieu. En revanche, le haut de M2, et les hélices M3 et M4 sont plus proche des structures Apo et en complexe avec l'inhibiteur tropisétron. On peut faire le parallèle entre cet intermédiaire et l'état pré-actif de GLIC. Dans les deux cas, l'intermédiaire semble être proche de l'état actif et on peut se demander s'il peut correspondre à un état *flipped* pour lequel l'ouverture du canal serait le dernier évènement conduisant à l'état actif. Pour le 5-HT_{3A}, on mesure un certain nombre de différences dans le TMD entre l'état actif et intermédiaire fermé en présence de sérotonine. De plus le mouvement du haut de l'hélice M2 est mesuré en VCF à des concentrations légèrement plus faibles que l'activation et suggère qu'un état intermédiaire supplémentaire avec le canal encore fermé et le mouvement du haut de M2 pourrait exister.

En ce qui concerne le GlyR $\alpha 1$ humain, un criblage systématique a permis d'obtenir une dizaine de paires cystéine-tryptophane fonctionnelles qui pourront être étudiées par VCF avec différents fluorophores. Des ΔF ont déjà pu être observés sur quelques paires et une étude plus détaillée permettra d'affiner la compréhension des réorganisations de ce récepteur. La réorganisation mesurée par la paire de quenching Q219C K143W est assez inhabituelle puisqu'elle a lieu à des concentrations bien inférieures à celles nécessaire pour observer l'activation. Cette position du fluorophore en bas de l'ECD entre le segment pré-M1 et la Cys-loop suggère une réorganisation précoce à ce niveau, bien en amont de l'état *flipped*. Les mesures en présence de strychnine montrent que, à l'image des mutants de GLIC à l'interface entre sous-unités, des antagonistes peuvent avoir un effet allostérique favorisant une conformation particulière de l'état de repos qui serait flexible. Dans l'ensemble les informations sur GLIC et les RCPs eucaryotes permettent une meilleure compréhension du chemin conformationnel d'activation et des états intermédiaires impliqués. L'étude de l'effet

des mutations pathologiques et des modulateurs ouvre de nouvelles perspectives pour la conception de molécules spécifiques des intermédiaires de l'activation par exemple.

Les études des réorganisations de GLIC et des RCPs eucaryotes, montrent la pertinence de combiner les mesures par fluorescence et l'analyse des structures. Ces approches sont hautement complémentaires : la fluorescence permettant d'assigner des structures à des états physiologiques pertinents et l'analyse des structures facilite l'interprétation des données obtenues par fluorescence. Avec l'augmentation du nombre de structures des RCPs résolues par cristallographie et microscopie électronique, l'apport de données par fluorescence sera un atout pour mieux caractériser les conformations obtenues et vérifier leur pertinence physiologique.

Dans ce travail, certains phénotypes observés en fluorescence sont difficilement interprétables. Par exemple, c'est le cas lorsque des mutations de GLIC perturbent localement la structure dans la région où le fluorophore et/ou le quencher sont incorporés. Également en VCF, un fluorophore trop large ne permet pas une évaluation claire de son mouvement par une simple interprétation des ΔF observés. Dans ces conditions l'utilisation d'approches complémentaires est nécessaire, en particulier par la modélisation et la dynamique moléculaire pour faire le pont entre les données structurales à haute résolution et les données de fluorescence. Il est en effet possible de modéliser le fluorophore greffé sur la protéine pour prédire sa position et sa distance avec les quenchers voisins. À l'inverse, il est aussi possible de valider par fluorescence les observations faites en modélisation. Enfin pour appuyer les interprétations, la formulation de modèles allostériques ou cinétique permettrait de rendre compte des données.

Combinées, les informations apportées par les études à l'équilibre sur GLIC et par VCF sur GlyR et 5-HT₃R apportent de nouvelles informations sur la caractérisation d'intermédiaires conformationnels dans les réorganisations des RCPs. La caractérisation d'un état précoce de l'activation chez GlyR et de réorganisations importantes de l'état de repos causées par des mutations chez GLIC laissent penser qu'un certain nombre de conformations intermédiaires existent en amont de l'état *flipped* ou de pré-activation et permettent d'élargir la vision de l'état de repos des RCPs. Il est possible que certaines mutations stabilisent des états intermédiaires qui sont très peu visités par le récepteur sauvage, et leur caractérisation

permettra une meilleure compréhension du paysage conformationnel accessible aux RCPs. L'accumulation des informations structurales issues des différentes études et les données de fluorescence de ce travail permettent de caractériser l'état de repos comme un état flexible que l'on peut représenter par un paysage conformationnel plutôt que par une conformation fixe.

Les pré-actif/*flipped*, actif et désensibilisé utilisés dans les modèles proviennent avant tout des informations fonctionnelles apportées par les études en électrophysiologie. En VCF un certain nombre de phénomènes observés ne sont pas précisément corrélés avec l'activation et le décalage de la courbe dose réponse vers les plus hautes/basses concentrations d'agonistes est parfois difficile à interpréter avec un modèle simple à quelques états. Il est possible que les états visibles en électrophysiologie comportent, tout comme l'état au repos, un certain degré de flexibilité qui pourrait expliquer les observations faites en VCF. Il se pourrait alors que la combinaison de sondes fluorescentes et de mutations permette d'explorer certains espaces du paysage conformationnel des RCPs qui sont encore inconnus.

ANNEXES

Annexes

Références

- Akabas, M. H., Stauffer, D. A., Xu, M., & Karlin, A. (1992). Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science*, *258*(5080), 307–310. <https://doi.org/10.1126/science.1384130>
- Akk, G., & Steinbach, J. H. (2011). Structural Studies of the Actions of Anesthetic Drugs on the gamma-Aminobutyric Acid Type A Receptor. *Anesthesiology*, *115*(6), 1338–1348. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182315d93>
- Albuquerque, E. X., Pereira, E. F. R., Alkondon, M., & Rogers, S. W. (2009). Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews*, *89*(1), 73–120. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2008>
- Althoff, T., Hibbs, R. E., Banerjee, S., & Gouaux, E. (2014). X-ray structures of GluCl in apo states reveal a gating mechanism of Cys-loop receptors. *Nature*, *512*(7514), 333–337. <https://doi.org/10.1038/nature13669>
- Alzarea, S., & Rahman, S. (2018). Effects of alpha-7 nicotinic allosteric modulator PNU 120596 on depressive-like behavior after lipopolysaccharide administration in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *86*(May), 218–228. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2018.05.018>
- Auerbach, A., & Akk, G. (1998). Desensitization of Mouse Nicotinic Acetylcholine Receptor Channels. *The Journal of General Physiology*, *112*(2), 181–197. <https://doi.org/10.1085/jgp.112.2.181>
- Baburin, I., Beyl, S., & Hering, S. (2006). Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *453*(1), 117–123. <https://doi.org/10.1007/s00424-006-0125-y>
- Bafna, P. A., Purohit, P. G., & Auerbach, A. (2008). Gating at the mouth of the acetylcholine receptor channel: Energetic consequences of mutations in the α M2-Cap. *PLoS ONE*, *3*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002515>
- Baker, O. S., Larsson, H. P., Mannuzzu, L. M., & Isacoff, E. Y. (1998). Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating. *Neuron*, *20*(6), 1283–1294. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9655514>
- Barchad-Avitzur, O., Priest, M. F., Dekel, N., Bezanilla, F., Parnas, H., & Ben-Chaim, Y. (2016). A Novel Voltage Sensor in the Orthosteric Binding Site of the M2 Muscarinic Receptor. *Biophysical Journal*, *111*(7), 1396–1408. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.08.035>
- Basak, S., Gicheru, Y., Rao, S., Sansom, M. S. P., & Chakrapani, S. (2018). Cryo-EM reveals two distinct serotonin-bound conformations of full-length 5-HT3A receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0660-7>

- Basak, S., Schmandt, N., Gicheru, Y., & Chakrapani, S. (2017). Crystal structure and dynamics of a lipid-induced potential desensitized-state of a pentameric ligand-gated channel. *ELife*, *6*, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.23886>
- Bergmann, R., Kongsbak, K., Sørensen, P. L., Sander, T., & Balle, T. (2013). A Unified Model of the GABAA Receptor Comprising Agonist and Benzodiazepine Binding Sites. *PLoS ONE*, *8*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052323>
- Bertozzi, C., Zimmermann, I., Engeler, S., Hilf, R. J. C., & Dutzler, R. (2016). Signal Transduction at the Domain Interface of Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *PLoS Biology*, *14*(3), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002393>
- Betz, H., & Laube, B. (2006). Glycine receptors: Recent insights into their structural organization and functional diversity. *Journal of Neurochemistry*, *97*(6), 1600–1610. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03908.x>
- Biskup, C., Kusch, J., Schulz, E., Nache, V., Schwede, F., Lehmann, F., ... Benndorf, K. (2007). Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature*, *446*(7134), 440–443. <https://doi.org/10.1038/nature05596>
- Blunck, R., Starace, D. M., Correa, A. M., & Bezanilla, F. (2004). Detecting rearrangements of shaker and NaChBac in real-time with fluorescence spectroscopy in patch-clamped mammalian cells. *Biophysical Journal*, *86*(6), 3966–3980. <https://doi.org/10.1529/biophysj.103.034512>
- Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., & Corringer, P.-J. (2009). X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature*, *457*(7225), 111–114. <https://doi.org/10.1038/nature07462>
- Bocquet, N., Prado de Carvalho, L., Cartaud, J., Neyton, J., Le Poupon, C., Taly, A., ... Corringer, P.-J. (2007). A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature*, *445*(7123), 116–119. <https://doi.org/10.1038/nature05371>
- Bode, A., & Lynch, J. W. (2014). The impact of human hyperekplexia mutations on glycine receptor structure and function. *Molecular Brain*, *7*(2), 1–12.
- Bonifacio, G., Lelli, C. I. S., & Kellenberger, S. (2014). Protonation controls ASIC1a activity via coordinated movements in multiple domains. *The Journal of General Physiology*, *143*(1), 105–118. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311053>
- Borisenko, V., Loughheed, T., Hesse, J., Füreder-Kitzmüller, E., Fertig, N., Behrends, J. C., ... Schütz, G. J. (2003). Simultaneous optical and electrical recording of single gramicidin channels. *Biophysical Journal*, *84*(1), 612–622. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74881-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74881-4)
- Bourne, Y., Talley, T. T., Hansen, S. B., Taylor, P., & Marchot, P. (2005). Crystal structure of a Cbtx-AChBP complex reveals essential interactions between snake α -neurotoxins and nicotinic receptors. *EMBO Journal*, *24*(8), 1512–1522. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600620>
- Brejč, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van der Oost, J., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, *411*(6835), 269–276.

- Brisson, A., & Unwin, P. N. T. (1985). Quaternary structure of the acetylcholine receptor. *Nature*, *315*(6019), 474–477. <https://doi.org/10.1038/315474a0>
- Brunette, A. M. J., & Farrens, D. L. (2014). Distance Mapping in Proteins Using Fluorescence Spectroscopy: Tyrosine, like Tryptophan, Quenches Bimane Fluorescence in a Distance-Dependent Manner.
- Burgos, C. F., Yevenes, G. E., & Aguayo, L. G. (2016). Structure and Pharmacologic Modulation of Inhibitory Glycine Receptors. *Molecular Pharmacology*, *90*(3), 318–325. <https://doi.org/10.1124/mol.116.105726>
- Burzomato, V., Beato, M., Groot-Kormelink, P., Colquhoun, D., & Sivilotti, L. (2004). Single-Channel Behavior of Heteromeric 1 Glycine Receptors: An Attempt to Detect a Conformational Change before the Channel Opens. *Journal of Neuroscience*, *24*(48), 10924–10940. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3424-04.2004>
- Cartaud, J., Benedetti, E. L., Cohen, J. B., Meunier, J.-C., & Changeux, J.-P. (1973). Presence of a lattice structure in membrane fragments rich in nicotinic receptor protein from the electric organ of *Torpedo marmorata*. *FEBS Letters*, *33*(1), 109–113. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80171-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80171-1)
- Celie, P. H. N., Van Rossum-Fikkert, S. E., Van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B., & Sixma, T. K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron*, *41*(6), 907–914. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00115-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00115-1)
- Cerdan, A. H., Martin, N. É., & Cecchini, M. (2018). An Ion-Permeable State of the Glycine Receptor Captured by Molecular Dynamics. *Structure*, *26*(11), 1555-1562.e4. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.07.019>
- Cha, A., & Bezanilla, F. (1997). Characterizing voltage-dependent conformational changes in the Shaker K⁺ channel with fluorescence. *Neuron*, *19*, 1127–1140. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80403-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80403-1)
- Cha, Albert, Snyder, G. E., Selvin, P. R., & Bezanilla, F. (1999). Atomic scale movement of the voltage-sensing region in potassium channel measured via spectroscopy. *Nature*, *396*(1997), 809–813.
- Chang, Y., & Weiss, D. S. (2002). Site-specific fluorescence reveals distinct structural changes with GABA receptor activation and antagonism. *Nature Neuroscience*, *5*(11), 1163–1168. <https://doi.org/10.1038/nn926>
- Changeux, J., & Edelstein, S. (1998). Allosteric Receptors after 30 Years Review. *Neuron*, *21*, 959–980. Retrieved from http://www.unige.ch/sciences/biochimie/Edelstein/neruon_review.pdf
- Changeux, J. P. (1961). The feedback control mechanisms of biosynthetic L-threonine deaminase by L-isoleucine. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *26*, 313–318. <https://doi.org/10.1101/SQB.1961.026.01.037>
- Chen, Q., Kinde, M. N., Arjunan, P., Wells, M. M., Cohen, A. E., Xu, Y., & Tang, P. (2015). Direct Pore Binding as a Mechanism for Isoflurane Inhibition of the Pentameric Ligand-gated Ion Channel ELIC. *Scientific Reports*, *5*(June), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep13833>

- Chen, Q., Wells, M. M., Arjunan, P., Tillman, T. S., Cohen, A. E., Xu, Y., & Tang, P. (2018). Structural basis of neurosteroid anesthetic action on GABA A receptors. *Nature Communications*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06361-4>
- Cheng, Y. (2018). Membrane protein structural biology in the era of single particle cryo-EM. *Current Opinion in Structural Biology*, *52*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2018.08.008>
- Chock, P. B. (1971). Relaxation methods and enzymology. *Biochimie*, *53*(2), 161–172. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(71\)80048-2](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(71)80048-2)
- Choquet, D., & Triller, A. (2013). The dynamic synapse. *Neuron*, *80*(3), 691–703. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.013>
- Christopoulos, A., Changeux, J.-P., Catterall, W. A., Fabbro, D., Burriss, T. P., Cidlowski, J. A., ... Langmead, C. J. (2014). International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XC. Multisite Pharmacology: Recommendations for the Nomenclature of Receptor Allosterism and Allosteric Ligands. *Pharmacological Reviews*, *66*(4), 918–947. <https://doi.org/10.1124/pr.114.008862>
- Collingridge, G. L., Olsen, R. W., Peters, J., & Spedding, M. (2009). A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology*, *56*(1), 2–5. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.06.063>
- Corringer, P.-J., Bertrand, S., Bohler, S., Edelstein, S. J., Changeux, J.-P., & Bertrand, D. (1998). Critical Elements Determining Diversity in Agonist Binding and Desensitization of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Neuroscience*, *18*(2), 648–657. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.18-02-00648.1998>
- Corringer, P. J., Bertrand, S., Galzi, J. L., Devillers-Thiéry, A., Changeux, J. P., & Bertrand, D. (1999). Mutational analysis of the charge selectivity filter of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron*, *22*(4), 831–843. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80741-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80741-2)
- Cui, Q., & Karplus, M. (2008). Allostery and cooperativity revisited. *Protein Science*, *17*, 1295–1307. <https://doi.org/10.1110/ps.03259908.coined>
- Dahan, D. S., Dibas, M. I., Petersson, E. J., Auyeung, V. C., Chanda, B., Bezanilla, F., ... Lester, H. A. (2004). A fluorophore attached to nicotinic acetylcholine receptor beta M2 detects productive binding of agonist to the alpha delta site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(27), 10195–10200. <https://doi.org/10.1073/pnas.0301885101>
- Dahan, M., Lévi, S., Luccardini, C., Rostaing, P., Riveau, B., & Triller, A. (2003). Diffusion Dynamics of Glycine Receptors Revealed by Single-Quantum Dot Tracking. *Science*, *302*(5644), 442–445. <https://doi.org/10.1126/science.1088525>
- Das, P., & Dillon, G. H. (2005). Molecular Determinants of Picrotoxin Inhibition of 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *314*(1), 320–328. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.080325>
- Del Castillo, J., & Katz, B. (1956). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Drug Interaction*.

- Delbart, F., Brams, M., Gruss, F., Noppen, S., Peigneur, S., Boland, S., ... Ulens, C. (2018). An allosteric binding site of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor revealed in a humanized acetylcholine-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*, *293*(7), 2534–2545. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.815316>
- Dellisanti, C. D., Ghosh, B., Hanson, S. M., Raspanti, J. M., Grant, V. A., Diarra, G. M., ... Czajkowski, C. (2013). Site-directed spin labeling reveals pentameric ligand-gated ion channel gating motions. *PLoS Biology*, *11*(11), e1001714. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001714>
- Dellisanti, C. D., Hanson, S. M., Chen, L., & Czajkowski, C. (2011). Packing of the extracellular domain hydrophobic core has evolved to facilitate pentameric ligand-gated ion channel function. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(5), 3658–3670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.156851>
- Dellisanti, C. D., Yao, Y., Stroud, J. C., Wang, Z. Z., & Chen, L. (2007). Crystal structure of the extracellular domain of nAChR $\alpha 1$ bound to α -bungarotoxin at 1.94 Å resolution. *Nature Neuroscience*, *10*(8), 953–962. <https://doi.org/10.1038/nn1942>
- Dent, J. A. (2010). The evolution of pentameric ligand-gated ion channels. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *683*, 11–23. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6445-8_2
- Desdouits, N., Nilges, M., & Blondel, A. (2015). Principal Component Analysis reveals correlation of cavities evolution and functional motions in proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, *55*, 13–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2014.10.011>
- Dineley, K. T., Pandya, A. A., & Yakel, J. L. (2015). Nicotinic ACh Receptors as Therapeutic Targets in CNS Disorders. *Trends in Pharmacological Sciences*, *36*(2), 96–108. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.182>
- Doose, S., Neuweiler, H., & Sauer, M. (2009). Fluorescence quenching by photoinduced electron transfer: A reporter for conformational dynamics of macromolecules. *ChemPhysChem*, *10*(9–10), 1389–1398. <https://doi.org/10.1002/cphc.200900238>
- Dosemeci, A., Weinberg, R. J., Reese, T. S., & Tao-Cheng, J. H. (2016). The postsynaptic density: There is more than meets the eye. *Frontiers in Synaptic Neuroscience*, *8*(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnsyn.2016.00023>
- Du, J., Wei, L., Wu, S., Cheng, Y., & Gouaux, E. (2015). Glycine receptor mechanism elucidated by electron cryo-microscopy. <https://doi.org/10.1038/nature14853>
- Eigen, M. (1968). New looks and outlooks on physical enzymology. *Quarterly Reviews of Biophysics*, *1*(01), 3. <https://doi.org/10.1017/s0033583500000445>
- Erkkila, B. E., Weiss, D. S., & Wotring, V. E. (2004). Picrotoxin-mediated antagonism of $\alpha 3\beta 4$ and $\alpha 7$ acetylcholine receptors. *Neuroreport*, *15*(12), 1969–1973.
- Farrens, D. L. (2014). What site-directed labeling studies tell us about the mechanism of rhodopsin activation and G-protein binding. *Photochemistry Photobiology Sciences*, *9*(11), 1466–1474. <https://doi.org/10.1039/c0pp00283f>
- Fink, K. B., & Gothert, M. (2007). 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release.

- Pharmacological Reviews*, 59(4), 360–417. <https://doi.org/10.1124/pr.107.07103>
- Fourati, Z., Howard, R. J., Heusser, S. A., Hu, H., Ruza, R. R., Sauguet, L., ... Delarue, M. (2018). Structural Basis for a Bimodal Allosteric Mechanism of General Anesthetic Modulation in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Cell Reports*, 23(4), 993–1004. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.108>
- Frauenfelder, H., Sligar, S. G., & Wolynes, P. G. (1991). The Energy Landscapes and Motions of Proteins. *Science*, 254(9), 1598–1603.
- Fritschy, J. M., Harvey, R. J., & Schwarz, G. (2008). Gephyrin: where do we stand, where do we go? *Trends in Neurosciences*, 31(5), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.02.006>
- Fryatt, A. G., Dayl, S., Cullis, P. M., Schmid, R., & Evans, R. J. (2016). Mechanistic insights from resolving ligand-dependent kinetics of conformational changes at ATP-gated P2X1R ion channels. *Scientific Reports*, 6(September), 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep32918>
- George, A. A., Bloy, A., Miwa, J. M., Lindstrom, J. M., Lukas, R. J., & Whiteaker, P. (2017). Isoform-specific mechanisms of $\alpha 3\beta 4^*$ -nicotinic acetylcholine receptor modulation by the prototoxin lynx1. *FASEB Journal*, 31(4), 1398–1420. <https://doi.org/10.1096/fj.201600733R>
- Gielen, M., & Corringer, P. J. (2018). The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization. *Journal of Physiology*, 596(10), 1873–1902. <https://doi.org/10.1113/JP275100>
- Gielen, M., Thomas, P., & Smart, T. G. (2015). The desensitization gate of inhibitory Cys-loop receptors. *Nature Communications*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1038/ncomms7829>
- Goehring, A., Lee, C.-H., Wang, K. H., Carlisle Michel, J., Claxton, D. P., Bacongus, I., ... Gouaux, E. (2014). Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies. *Nature Protocols*, 150(9), 2574–2585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.173>
- Gordon, S. E., Munari, M., & Zagotta, W. N. (2018). Visualizing conformational dynamics of proteins in solution and at the cell membrane. *BioRxiv Biochemistry*, (206), 1–31. <https://doi.org/10.1101/294538>
- Grosman, C., Zhou, M., & Auerbach, A. (2000). Mapping conformational wave of AchR channel gating. *Nature*, 403(February), 4. Retrieved from <papers2://publication/uuid/1AB12E8F-9B77-4A30-AA84-09931F103978>
- Guo, J., & Zhou, H. X. (2016). Protein Allostery and Conformational Dynamics. *Chemical Reviews*, 116(11), 6503–6515. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00590>
- Gupta, D., Prabhakar, V., & Radhakrishnan, M. (2016). 5HT3 receptors: Target for new antidepressant drugs. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 64, 311–325. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2016.03.001>
- Gupta, S., Chakraborty, S., Vij, R., & Auerbach, A. (2016). A mechanism for acetylcholine receptor gating based on structure, coupling, phi, and flip. *The Journal of General Physiology*, 1–19. <https://doi.org/10.1085/jgp.201611673>
- Ha, T., & Tinnefeld, P. (2012). Photophysics of Fluorescence Probes for Single Molecule

- Biophysics and Super-Resolution Imaging. *Annual Review of Physical Chemistry*, 63, 595–617. <https://doi.org/10.1146/annurev-physchem-032210-103340>. Photophysics
- Halevi, S., McKay, J., & Palfreyman, M. (2002). The *C.elegans* ric-3 gene is required for maturation of nicotinic acetylcholine receptors. *EMBO Journal*, 21(5), 1012–1020. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.5.1012>
- Han, L., Talwar, S., & Lynch, J. W. (2013). The relative orientation of the TM3 and TM4 domains varies between $\alpha 1$ and $\alpha 3$ glycine receptors. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(2), 248–254. <https://doi.org/10.1021/cn300177g>
- Han, L., Talwar, S., Wang, Q., Shan, Q., & Lynch, J. W. (2013). Phosphorylation of $\alpha 3$ Glycine Receptors Induces a Conformational Change in the Glycine-Binding Site. *ACS Chemical Neuroscience*, 4(10), 1361–1370. <https://doi.org/10.1021/cn400097j>
- Han, N.-L. R., Clements, J. D., & Lynch, J. W. (2004). Comparison of Taurine- and Glycine-induced Conformational Changes in the M2-M3 Domain of the Glycine Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 279(19), 19559–19565. <https://doi.org/10.1074/jbc.M400548200>
- Hansen, S. B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., & Bourne, Y. (2005). Structures of *Aplysia* AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. *EMBO Journal*, 24(20), 3635–3646. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600828>
- Harms, G. S., Orr, G., Montal, M., Thrall, B. D., Colson, S. D., & Lu, H. P. (2003). Probing conformational changes of gramicidin ion channels by single-molecule patch-clamp fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 85(3), 1826–1838. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74611-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74611-6)
- Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Tol, M. B., Hovius, R., ... Nury, H. (2014). X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature*, 512, 276–281. <https://doi.org/10.1038/nature13552>
- Hassaine, G., Deluz, C., Li, X. D., Graff, A., Vogel, H., & Nury, H. (2013). Large scale expression and purification of the mouse 5-HT₃ receptor. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1828(11), 2544–2554. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.028>
- Hattori, M., Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2012). A fluorescence-detection size-exclusion chromatography-based thermostability assay for membrane protein precrystallization screening. *Structure*, 20(8), 1293–1299. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.06.009>
- Hawthorne, R., Cromer, B. A., Ng, H. L., Parker, M. W., & Lynch, J. W. (2006). Molecular determinants of ginkgolide binding in the glycine receptor pore. *Journal of Neurochemistry*, 98(2), 395–407. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03875.x>
- Herguedas, B., García-Nafría, J., Cais, O., Fernández-Leiro, R., Krieger, J., Ho, H., & Greger, I. H. (2016). Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors. *Science*, 352(6285), aad3873. <https://doi.org/10.1126/science.aad3873>
- Hernandez, C. C., & Macdonald, R. L. (2019a). A Structural look at GABA A receptor mutations linked to epilepsy syndromes. *Brain Research*, 1714(July 2018), 234–247. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.03.004>

- Hernandez, C. C., & Macdonald, R. L. (2019b). A Structural Look at GABAA Receptor Mutations Linked to Epilepsy Syndromes. *Brain Research*, (March). <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2019.03.004>
- Heusser, S. A., Lycksell, M., Wang, X., McComas, S. E., Howard, R. J., & Lindahl, E. (2018). Allosteric potentiation of a ligand-gated ion channel is mediated by access to a deep membrane-facing cavity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(42), 10672–10677. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809650115>
- Hibbs, R. E., & Gouaux, E. (2011). Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*, *474*(7349), 54–60. <https://doi.org/10.1038/nature10139>
- Hilf, R. J. C., & Dutzler, R. (2008). X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*, *452*(7185), 375–379. <https://doi.org/10.1038/nature06717>
- Hilf, R. J. C., & Dutzler, R. (2009). Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*, *457*(7225), 115–118. <https://doi.org/10.1038/nature07461>
- Hill, A. (1910). The possible effects of aggregation of the molecules of hoemoglobin on its dissociation curves. *The Journal of Physiology*, *40*, 4–7.
- Hirose, S. (2014). *Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 213). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63326-2.00003-X>
- Howard, R. J., Murail, S., Ondricek, K. E., Corringer, P.-J., Lindahl, E., Trudell, J. R., & Harris, R. A. (2011). Structural basis for alcohol modulation of a pentameric ligand-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(29), 12149–12154. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104480108>
- Hu, H., Ataka, K., Menny, A., Fourati, Z., Sauguet, L., Corringer, P., ... Delarue, M. (2018). Electrostatics, proton sensor, and networks governing the gating transition in GLIC, a proton-gated pentameric ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(52), E12172–E12181. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813378116>
- Hu, H., Nemezc, Á., Van Renterghem, C., Fourati, Z., Sauguet, L., Delarue, M., & Corringer, P.-J. (2018). Crystal structures of a pentameric ion channel gated by alkaline pH show a widely open pore and identify a cavity for modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(17), E3959–E3968. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717700115>
- Huang, X., Chen, H., Michelsen, K., Schneider, S., & Shaffer, P. L. (2015). Crystal structure of human glycine receptor- $\alpha 3$ bound to antagonist strychnine. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature14972>
- Huang, X., Chen, H., & Shaffer, P. L. (2017). Crystal Structures of Human GlyR $\alpha 3$ Bound to Ivermectin. *Structure*, *25*(6), 945-950.e2. <https://doi.org/10.1016/j.str.2017.04.007>
- Huang, X., Shaffer, P. L., Ayube, S., Bregman, H., Chen, H., Lehto, S. G., ... Gingras, J. (2016). Crystal structures of human glycine receptor $\alpha 3$ bound to a novel class of analgesic potentiators. *Nature Structural & Molecular Biology*, (December), 1–9. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3329>

- Huang, Y., & Thathiah, A. (2015). Regulation of neuronal communication by G protein-coupled receptors. *FEBS Letters*, *589*(14), 1607–1619. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.05.007>
- Hunt, D. L., & Castillo, P. E. (2007). Project GRAD. What Works Clearinghouse Intervention Report. *Current Opinion in Neurobiology*, *22*(3), 15. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.01.007>. Synaptic
- Hurst, R. S., Hajo, M., Raggenbass, M., Wall, T. M., Higdon, N. R., Lawson, J. A., ... Arneric, S. P. (2005). A Novel Positive Allosteric Modulator of the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor : In Vitro and In Vivo Characterization. *The Journal of Neuroscience*, *25*(17), 4396–4405. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5269-04.2005>
- Ide, T., Takeuchi, Y., Aoki, T., & Yanagida, T. (2002). Simultaneous optical and electrical recording of a single ion-channel. *The Japanese Journal of Physiology*, *52*(5), 429–434. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.52.429>
- Islas, L. D., & Zagotta, W. N. (2006). Short-range molecular rearrangements in ion channels detected by tryptophan quenching of bimane fluorescence. *The Journal of General Physiology*, *128*(3), 337–346. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609556>
- Jaiteh, M., Taly, A., & Héning, J. (2016). Evolution of pentameric ligand-gated ion channels: Pro-loop receptors. *PLoS ONE*, *11*(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151934>
- Jue, T. (2017). *Modern tools of biophysics. Modern Tools of Biophysics*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6713-1>
- Kalappa, B. I., Sun, F., Johnson, S. R., Jin, K., & Uteshev, V. V. (2013). A positive allosteric modulator of $\alpha 7$ nAChRs augments neuroprotective effects of endogenous nicotinic agonists in cerebral ischaemia. *British Journal of Pharmacology*, *169*, 1862–1878. <https://doi.org/10.1111/bph.12247>
- Kalstrup, T., & Blunck, R. (2017). Voltage-clamp Fluorometry in Xenopus Oocytes Using Fluorescent Unnatural Amino Acids. *Journal of Visualized Experiments*, (123), 1–9. <https://doi.org/10.3791/55598>
- Kalstrup, T., & Blunck, R. (2018). S4–S5 linker movement during activation and inactivation in voltage-gated K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(29), E6751–E6759. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719105115>
- Karlin, A. (1967). On the application of “a plausible model” of allosteric proteins to the receptor for acetylcholine. *Journal of Theoretical Biology*, *16*(2), 306–320. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90011-2](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90011-2)
- Karlin, A., & Akabas, M. H. (1998). Substituted-cysteine accessibility method. *Methods in Enzymology*, *293*(1986), 123–145. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(98\)93011-7](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(98)93011-7)
- Kasuya, G., Yamaura, T., Ma, X. B., Nakamura, R., Takemoto, M., Nagumo, H., ... Nureki, O. (2017). Structural insights into the competitive inhibition of the ATP-gated P2X receptor channel. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00887-9>
- Katz, B., & Thesleff, S. (1957). A study of the ‘desensitization’ produced by acetylcholine at the motor end-plate. *The Journal of Physiology*, *138*(1), 63–80.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.1957.sp005838>

- Kawate, T., & Gouaux, E. (2006). Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography for Precrystallization Screening of Integral Membrane Proteins. *Structure*, *14*(4), 673–681. <https://doi.org/10.1016/j.str.2006.01.013>
- Kelley, S. P., Dunlop, J. I., Kirkness, E. F., Lambert, J. J., & Peters, J. A. (2003). A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature*, *424*, 321–324. Retrieved from <https://www.nature.com/nature/journal/v424/n6946/full/nature01788.html>
- Kesters, D., Thompson, A. J., Brams, M., Van Elk, R., Spurny, R., Geitmann, M., ... Ulens, C. (2013). Structural basis of ligand recognition in 5-HT₃ receptors. *EMBO Reports*, *14*(1), 49–56. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.189>
- Khatri, A., Sedelnikova, A., & Weiss, D. S. (2009). Structural rearrangements in loop F of the GABA receptor signal ligand binding, not channel activation. *Biophysical Journal*, *96*(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.011>
- Kinde, M. N., Chen, Q., Lawless, M. J., Mowrey, D. D., Xu, J., Saxena, S., ... Tang, P. (2015). Conformational Changes Underlying Desensitization of the Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC. *Structure*, *23*(6), 995–1004. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.03.017>
- Kirschner, K., Eigen, M., Bittman, R., & Voigt, B. (1966). The binding of nicotinamide-adenine dinucleotide to yeast D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: temperature-jump relaxation studies on the mechanism of an allosteric enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *56*(6), 1661–1667. <https://doi.org/10.1073/pnas.56.6.1661>
- Klose, D., Klare, J. P., Grohmann, D., Kay, C. W. M., Werner, F., & Steinhoff, H. J. (2012). Simulation vs. reality: A comparison of in silico distance predictions with DEER and FRET measurements. *PLoS ONE*, *7*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039492>
- Kohout, S. C., Bell, S. C., Liu, L., Xu, Q., Minor, D. L., & Isacoff, E. Y. (2010). Electrochemical coupling in the voltage-dependent phosphatase Ci-VSP. *Nature Chemical Biology*, *6*(5), 369–375. <https://doi.org/10.1038/nchembio1010-782a>
- Kohout, S. C., Ulbrich, M. H., Bell, S. C., & Isacoff, E. Y. (2008). Subunit organization and functional transitions in Ci-VSP. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(1), 106–108. <https://doi.org/10.1038/nsmb1320>
- Koshland, D. E., Nemethy, J. G., & Filmer, D. (1966). Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits. *Biochemistry*, *5*(1), 365–385. <https://doi.org/10.1021/bi00865a047>
- Koshland, Daniel E., & Hamadani, K. (2002). Proteomics and Models for Enzyme Cooperativity. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(49), 46841–46844. <https://doi.org/10.1074/jbc.r200014200>
- Kouvatsos, N., Giastas, P., Chroni-Tzartou, D., Pouloupoulou, C., & Tzartos, S. J. (2016). Crystal structure of a human neuronal nAChR extracellular domain in pentameric assembly: Ligand-bound $\alpha 2$ homopentamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(34), 9635–9640. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602619113>

- Koyama, Y., Kondo, M., & Shimada, S. (2017). Building a 5-HT_{3A} receptor expression map in the mouse brain. *Scientific Reports*, 7(March), 1–27. <https://doi.org/10.1038/srep42884>
- Kubelka, J. (2009). Time-resolved methods in biophysics. 9. Laser temperature-jump methods for investigating biomolecular dynamics. *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8(4), 499–512. <https://doi.org/10.1039/b819929a>
- Kusch, J., & Zifarelli, G. (2014). Patch-clamp fluorometry: Electrophysiology meets fluorescence. *Biophysical Journal*, 106(6), 1250–1257. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.02.006>
- Laha, K. T., Ghosh, B., & Czajkowski, C. (2013). Macroscopic kinetics of pentameric ligand gated ion channels: Comparisons between two prokaryotic channels and one eukaryotic channel. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080322>
- Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*.
- Lape, R., Colquhoun, D., & Sivilotti, L. G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. *Nature*, 454(7205), 722–727. <https://doi.org/10.1038/nature07139>
- Lavery, D., Desai, R., Uchański, T., Masiulis, S., Stec, W. J., Malinauskas, T., ... Aricescu, A. R. (2019). Cryo-EM structure of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ GABAA receptor in a lipid bilayer. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0833-4>
- Lavery, D., Thomas, P., Field, M., Andersen, O. J., Gold, M. G., Biggin, P. C., ... Smart, T. G. (2017). Crystal structures of a GABA A -receptor chimera reveal new endogenous neurosteroid-binding sites. *Nature Structural and Molecular Biology*, 24(11), 977–985. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3477>
- Lavis, L. D., & Raines, R. T. (2008). Bright ideas for chemical biology-supplement. *ACS Chemical Biology*, 3(3), 142–155. <https://doi.org/10.1021/cb700248m>
- LeBard, D. N., Hémin, J., Eckenhoff, R. G., Klein, M. L., & Brannigan, G. (2012). General anesthetics predicted to block the GLIC pore with micromolar affinity. *PLoS Computational Biology*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002532>
- Lecat-Guillet, N., Monnier, C., Rovira, X., Kniazeff, J., Lamarque, L., Zwier, J. M., ... Rondard, P. (2017). FRET-Based Sensors Unravel Activation and Allosteric Modulation of the GABA B Receptor. *Cell Chemical Biology*, 24(3), 360–370. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.02.011>
- Lee, E. E. L., & Bezanilla, F. (2019). Methodological improvements for fluorescence recordings in *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of General Physiology*, 151(2), 264–272. <https://doi.org/10.1085/jgp.201812189>
- Lev, B., Murail, S., Poitevin, F., Cromer, B. A., Baaden, M., Delarue, M., & Allen, T. W. (2017). String method solution of the gating pathways for a pentameric ligand-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(21), E4158–E4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617567114>
- Li, D., Liu, M. S., & Ji, B. (2015). Mapping the Dynamics Landscape of Conformational Transitions in Enzyme: The Adenylate Kinase Case. *Biophysical Journal*, 109(3), 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.059>

- Lindstrom, J., Walter, B., & Einarson, B. (1979). Immunochemical Similarities between Subunits of Acetylcholine Receptors from Torpedo, Electrophorus, and Mammalian Muscle. *Biochemistry*, *18*(21), 4470–4480. <https://doi.org/10.1021/bi00588a004>
- Liu, Q., DeChon, J., Li, G., Wu, J., Xue, F., Simard, A., ... Hu, G. (2009). A novel nicotinic acetylcholine receptor subtype in basal forebrain cholinergic neurons with high sensitivity to amyloid peptides. *Journal of Neuroscience*, *29*(4), 918–929. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3952-08.2009>
- Lorinczi, E., Bhargava, Y., Marino, S. F., Taly, A., Kaczmarek-Hajek, K., Barrantes-Freer, A., ... Nicke, A. (2012). Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(28), 11396–11401. <https://doi.org/10.1073/pnas.1118759109>
- Lynagh, T., & Lynch, J. W. (2012). Molecular mechanisms of Cys-loop ion channel receptor modulation by ivermectin. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *5*(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00060>
- Lynch, J. W. (2009). Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*, *56*(1), 303–309. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.07.034>
- Lynch, J. W., Rajendra, S., Pierce, K. D., Handford, C. a., Barry, P. H., & Schofield, P. R. (1997). Identification of intracellular and extracellular domains mediating signal transduction in the inhibitory glycine receptor chloride channel. *The EMBO Journal*, *16*(1), 110–120. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.1.110>
- Makino, H., & Malinow, R. (2009). AMPA Receptor Incorporation into Synapses during LTP: The Role of Lateral Movement and Exocytosis. *Neuron*, *64*(3), 381–390. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.08.035>
- Malosio, M., Marqueze, B., Pouey, A., Kuhse, J., & Betz, H. (1991). mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO Journal*, *10*(9), 2401–2409.
- Mannuzzu, L. M., Moronne, M. M., & Isacoff, E. Y. (1996). Direct Physical Measure of Conformational. *Science*, *4*, 2–5.
- Mansoor, S. E., DeWitt, M. a., & Farrens, D. L. (2010). Distance Mapping in Proteins Using Fluorescence Spectroscopy: The Tryptophan-Induced Quenching (TrIQ) Method. *Biochemistry*, *49*(45), 9722–9731. <https://doi.org/10.1021/bi100907m>
- Mansoor, S. E., Mchaourab, H. S., & Farrens, D. L. (2002). Mapping proximity within proteins using fluorescence spectroscopy. A study of T4 lysozyme showing that tryptophan residues quench bimane fluorescence. *Biochemistry*, *41*(8), 2475–2484. <https://doi.org/10.1021/bi011198i>
- Marmé, N., Knemeyer, J. P., Sauer, M., & Wolfrum, J. (2003). Inter- and Intramolecular Fluorescence Quenching of Organic Dyes by Tryptophan. *Bioconjugate Chemistry*, *14*(6), 1133–1139. <https://doi.org/10.1021/bc0341324>
- Masiulis, S., Desai, R., Uchański, T., Serna Martin, I., Laverty, D., Karia, D., ... Aricescu, A. R. (2019). GABA A receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology. *Nature*, *565*(7740), 454–459. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0832-5>

- Matsuda, K., Kanaoka, S., Akamatsu, M., & Sattelle, D. B. (2009). Diverse Actions and Target-Site Selectivity of Neonicotinoids: Structural Insights. *Molecular Pharmacology*, *76*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055186>
- Matta, J. A., Gu, S., Davini, W. B., Lord, B., Siuda, E. R., Harrington, A. W., & Bredt, D. S. (2017). NACHO Mediates Nicotinic Acetylcholine Receptor Function throughout the Brain. *Cell Reports*, *19*(4), 688–696. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.008>
- Menger, M., Eckstein, F., & Porschke, D. (2000). Multiple conformational states of the hammerhead ribozyme, broad time range of relaxation and topology of dynamics. *Nucleic Acids Research*, *28*(22), 4428–4434.
- Menny, A., Lefebvre, S. N., Schmidpeter, P. A. M., Drège, E., Fourati, Z., Delarue, M., ... Corringer, P. J. (2017). Identification of a pre-active conformation of a pentameric channel receptor. *ELife*, *6*, 1–28. <https://doi.org/10.7554/eLife.23955>
- Messerer, R., Kauk, M., Volpato, D., Alonso Canizal, M. C., Klöckner, J., Zabel, U., ... Holzgrabe, U. (2017). FRET Studies of Quinolone-Based Bitopic Ligands and Their Structural Analogues at the Muscarinic M1 Receptor. *ACS Chemical Biology*, *12*(3), 833–843. <https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00828>
- Miller, P. S., & Aricescu, R. (2014). Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature*, *512*, 270–275. <https://doi.org/10.1038/nature13293>
- Monet, D., Desdouts, N., Nilges, M., & Blondel, A. (2019). *mkgridXf*: Consistent Identification of Plausible Binding Sites Despite the Elusive Nature of Cavities and Grooves in Protein Dynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *59*, acs.jcim.9b00103. research-article. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.9b00103>
- Monod, J., Changeux, J., & Jacob, F. (1963). Allosteric proteins and cellular control systems. *Journal of Molecular Biology*, *6*(4), 306–329. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(63\)80091-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(63)80091-1)
- Monod, J., & Jacob, F. (1961). General Conclusions: Teleonomic Mechanisms in Cellular Metabolism Growth Differentiation. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (pp. 389–401).
- Monod, J., Wyman, J., & Changeux, J. (1965). On the nature of allosteric transitions: A plausible model. *Journal of Molecular Biology*, *12*(1), 88–118. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80285-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80285-6)
- Mony, L., Berger, T. K., & Isacoff, E. Y. (2015). A specialized molecular motion opens the Hv1 voltage-gated proton channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, *22*(4), 283–290. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2978>
- Moraga-Cid, G., Sauguet, L., Huon, C., Malherbe, L., Girard-Blanc, C., Petres, S., ... Corringer, P.-J. (2015). Allosteric and hyperekplexic mutant phenotypes investigated on an $\alpha 1$ glycine receptor transmembrane structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(9), 2865–2870. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417864112>
- Morales-Perez, C. L., Noviello, C. M., & Hibbs, R. E. (2016). X-ray structure of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, *538*(7625), 411–415. <https://doi.org/10.1038/nature19785>

- Mortensen, M., & Smart, T. G. (2007). Single-channel recording of ligand-gated ion channels. *Nature Protocols*, 2(11), 2826–2841. <https://doi.org/10.1101/pdb.top087239>
- Motlagh, H. N., Wrabl, J. O., Li, J., & Hilser, V. J. (2014). The ensemble nature of allostery. *Nature*, 508(7496), 331–339. <https://doi.org/10.1038/nature13001>
- Mouroto, A., Bamberg, E., & Rettinger, J. (2008). Agonist- and competitive antagonist-induced movement of loop 5 on the α subunit of the neuronal $\alpha 4\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor. *Journal of Neurochemistry*, 105(2), 413–424. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05151.x>
- Mowrey, D. D., Cui, T., Jia, Y., Ma, D., Makhov, A. M., Zhang, P., & Tang, P. (2013). Short Article Open-Channel Structures of the Human Glycine Receptor $\alpha 1$ Full-Length Transmembrane Domain. *Structure*, 21(10), 1897–1904. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.07.014>
- Mowrey, D. D., Kinde, M. N., Xu, Y., & Tang, P. (2015). Atomistic insights into human Cys-loop receptors by solution NMR. *BBA - Biomembranes*, 1848(1), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2014.03.014>
- Mukhtasimova, N., Lee, W. Y., Wang, H.-L., & Sine, S. M. (2009). Detection and trapping of intermediate states priming nicotinic receptor channel opening. *Nature*, 459(7245), 451–454. <https://doi.org/10.1038/nature07923>
- Mulle, C., Léna, C., & Changeux, J. P. (1992). Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron*, 8(5), 937–945. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90208-U](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90208-U)
- Muroi, Y., Theusch, C. M., Czajkowski, C., & Jackson, M. B. (2009). Distinct structural changes in the GABA A receptor elicited by pentobarbital and GABA. *Biophysical Journal*, 96(2), 499–509. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.09.037>
- Neher, E., & Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres, 260, 799–802.
- Nemecz, Á., Hu, H., Fourati, Z., Van Renterghem, C., Delarue, M., & Corringer, P. J. (2017). Full mutational mapping of titratable residues helps to identify proton-sensors involved in the control of channel gating in the *Gloeobacter violaceus* pentameric ligand-gated ion channel. *PLoS Biology*, 15(12), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2004470>
- Nemecz, Á., Prevost, M. S., Menny, A., & Corringer, P. J. (2016). Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron*, 90(3), 452–470. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2016.03.032>
- Nemecz, Á., & Taylor, P. (2011). Creating an $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Recognition Domain from the Acetylcholine-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 286(49), 42555–42565. <https://doi.org/10.1074/jbc.m111.286583>
- Nievas, G. A. F., Barrantes, F. J., & Antollini, S. S. (2008). Modulation of nicotinic acetylcholine receptor conformational state by free fatty acids and steroids. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), 21478–21486. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800345200>
- Niswender, C. M., & Conn, P. J. (2010). Metabotropic Glutamate Receptors: Physiology, Pharmacology, and Disease. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 50(1),

295–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533>

- Nury, H., Bocquet, N., Le Poupon, C., Raynal, B., Haouz, A., Corringer, P.-J., & Delarue, M. (2010). Crystal Structure of the Extracellular Domain of a Bacterial Ligand-Gated Ion Channel. *Journal of Molecular Biology*, *395*(5), 1114–1127. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.11.024>
- Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., ... Corringer, P.-J. (2011). X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature*, *469*(7330), 428–431. <https://doi.org/10.1038/nature09647>
- Olofsson, L., Felekyan, S., Doumazane, E., Scholler, P., Fabre, L., Zwier, J. M., ... Margeat, E. (2014). Fine tuning of sub-millisecond conformational dynamics controls metabotropic glutamate receptors agonist efficacy. *Nature Communications*, *5*, 5206. <https://doi.org/10.1038/ncomms6206>
- Pan, J., Chen, Q., Willenbring, D., Yoshida, K., Tillman, T., Kashlan, O. B., ... Tang, P. (2012). Structure of the pentameric ligand-gated ion channel ELIC cocrystallized with its competitive antagonist acetylcholine. *Nature Communications*, *3*, 714–718. <https://doi.org/10.1038/ncomms1703>
- Pantazis, A., & Olcese, R. (2012). Relative transmembrane segment rearrangements during BK channel activation resolved by structurally assigned fluorophore–quencher pairing. *The Journal of General Physiology*, *140*(2), 207–218. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210807>
- Pantazis, A., Westerberg, K., Althoff, T., Abramson, J., & Olcese, R. (2018). Harnessing photoinduced electron transfer to optically determine protein sub-nanoscale atomic distances. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07218-6>
- Papke, D., Gonzalez-Gutierrez, G., & Grosman, C. (2011). Desensitization of neurotransmitter-gated ion channels during high-frequency stimulation: A comparative study of Cys-loop, AMPA and purinergic receptors. *Journal of Physiology*, *589*(7), 1571–1585. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.203315>
- Perutz, M., Rossmann, M., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G., & North, A. C. T. (1960). Structure of haemoglobin. *Nature*, *185*, 416–422.
- Peters, J. A., Hales, T. G., & Lambert, J. J. (1988). Divalent cations modulate 5-HT₃ receptor-induced currents in N1E-115 neuroblastoma cells. *European Journal of Pharmacology*, *151*(3), 491–495. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(88\)90550-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(88)90550-X)
- Phulera, S., Zhu, H., Claxton, D., Yoder, N., Yu, J., Yoshioka, C., & Gouaux, E. (2018). Cryo-EM structure of the benzodiazepine-sensitive $\alpha 1\beta 1\gamma 2\delta$ tri-heteromeric GABA_A receptor in complex with GABA. *ELIFE*, *1*(i), 1–21.
- Pless, S. a., Dibas, M. I., Lester, H. a., & Lynch, J. W. (2007). Conformational Variability of the Glycine Receptor M2 Domain in Response to Activation by Different Agonists. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(49), 36057–36067. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706468200>
- Pless, S. a., & Lynch, J. W. (2009a). Distinct conformational changes in activated agonist-bound and agonist-free glycine receptor subunits. *Journal of Neurochemistry*, *108*(6), 1585–1594. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05930.x>

- Pless, S. a., & Lynch, J. W. (2009b). Ligand-specific conformational changes in the alpha1 glycine receptor ligand-binding domain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(23), 15847–15856. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809343200>
- Pless, S. a., & Lynch, J. W. (2009c). Magnitude of a Conformational Change in the Glycine Receptor 1- 2 Loop Is Correlated with Agonist Efficacy. *Journal of Biological Chemistry*, 284(40), 27370–27376. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.048405>
- Polovinkin, L., Hassaine, G., Perot, J., Neumann, E., Jensen, A. A., Lefebvre, S. N., ... Nury, H. (2018). Conformational transitions of the serotonin 5-HT 3 receptor. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0672-3>
- Prevost, M. S., Delarue-Cochin, S., Marteaux, J., Colas, C., Van Renterghem, C., Blondel, A., ... Joseph, D. (2013). Identification of cinnamic acid derivatives as novel antagonists of the prokaryotic proton-gated ion channel GLIC. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(11), 4619–4630. <https://doi.org/10.1021/jm400374q>
- Prevost, M. S., Sauguet, L., Nury, H., Van Renterghem, C., Huon, C., Poitevin, F., ... Corringer, P.-J. (2012). A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(6), 642–649. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2307>
- Purohit, P., & Auerbach, A. (2009). Unliganded gating of acetylcholine receptor channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(1), 115–120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809272106>
- Qiu, F., Chamberlin, A., Watkins, B. M., Ionescu, A., Perez, M. E., Barro-Soria, R., ... Larsson, H. P. (2016). Molecular mechanism of Zn²⁺ inhibition of a voltage-gated proton channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(40), E5962–E5971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604082113>
- Ramstein, J., Ehrenberg, M., & Rigler, R. (1980). Fluorescence Relaxation of Proflavin-Deoxyribonucleic Acid Interaction. Kinetic Properties of a Base-Specific Reaction. *Biochemistry*, 19(17), 3938–3948. <https://doi.org/10.1021/bi00558a008>
- Rexroth, S., Mullineaux, C. W., Ellinger, D., Sendtko, E., Rögner, M., & Koenig, F. (2011). The Plasma Membrane of the Cyanobacterium *Gloeobacter violaceus* Contains Segregated Bioenergetic Domains. *The Plant Cell*, 23(6), 2379–2390. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.085779>
- Rigler, R., & Widengren, J. (2018). Fluorescence-based monitoring of electronic state and ion exchange kinetics with FCS and related techniques: from T-jump measurements to fluorescence fluctuations. *European Biophysics Journal*, 47(4), 479–492. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1271-1>
- Rodrigues-Pinguet, N. O. (2005). Mutations Linked to Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy Affect Allosteric Ca²⁺ Activation of the $\alpha 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Molecular Pharmacology*, 68(2), 487–501. <https://doi.org/10.1124/mol.105.011155>
- Ruan, Y., Kao, K., Lefebvre, S., Marchesi, A., Corringer, P.-J., Hite, R. K., & Scheuring, S. (2018). Structural titration of receptor ion channel GLIC gating by HS-AFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201805621.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1805621115>

- Rudolph, U., & Möhler, H. (2014). GABA_A Receptor Subtypes: Therapeutic Potential in Down Syndrome, Affective Disorders, Schizophrenia, and Autism. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 54(1), 483–507. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011613-135947>
- Saccone, N. L., Wang, J. C., Breslau, N., Johnson, E. O., Hatsukami, D., Saccone, S. F., ... Bierut, L. J. (2009). The CHRNA5-CHRNA3-CHRNA4 nicotinic receptor subunit gene cluster affects risk for nicotine dependence in African-Americans and in European-Americans. *Cancer Research*, 69(17), 6848–6856. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0786>
- Sakata, S., Jinno, Y., Kawanabe, A., & Okamura, Y. (2016). Voltage-dependent motion of the catalytic region of voltage-sensing phosphatase monitored by a fluorescent amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(27), 7521–7526. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604218113>
- Sakmann, B., Patlak, J., & Neher, E. (1980). Single acetylcholine-activated channels show burst-kinetics in presence of desensitizing concentrations of agonist. *Nature*, 286(5768), 71–73. <https://doi.org/10.1038/286071a0>
- San Martín, V. P., Burgos, C. F., Marileo, A. M., Lara, C. O., Sazo, A., Fuentealba, J., ... Yévenes, G. E. (2019). Inhibitory Actions of Tropeines on the $\alpha 3$ Glycine Receptor Function. *Frontiers in Pharmacology*, 10(April), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00331>
- Sauguet, L., Howard, R. J., Malherbe, L., Lee, U. S., Corringer, P.-J., Adron Harris, R., & Delarue, M. (2013). Structural basis for potentiation by alcohols and anaesthetics in a ligand-gated ion channel. *Nature Communications*, 4, 1697. <https://doi.org/10.1038/ncomms2682>
- Sauguet, L., Poitevin, F., Murail, S., Van Renterghem, C., Moraga-Cid, G., Malherbe, L., ... Delarue, M. (2013). Structural basis for ion permeation mechanism in pentameric ligand-gated ion channels. *The EMBO Journal*, 32(5), 728–741. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.17>
- Sauguet, L., Shahsavari, A., & Delarue, M. (2015). Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850(3), 511–523. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.05.007>
- Sauguet, L., Shahsavari, A., Poitevin, F., Huon, C., Menny, A., Nemeček, A., ... Delarue, M. (2014). Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 966–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.1314997111>
- Saul, B., Kuner, T., Sobetzko, D., Brune, W., Hanefeld, F., Meinck, H.-M., & Becker, C.-M. (1999). Novel GLRA1 Missense Mutation (P250T) in Dominant Hyperekplexia Defines an Intracellular Determinant of Glycine Receptor Channel Gating. *The Journal of Neuroscience*, 19(3), 869–877. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-03-00869.1999>
- Schaefer, N., Vogel, N., & Villmann, C. (2012). Glycine receptor mutants of the mouse: what are possible routes of inhibitory compensation? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(October), 98. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00098>

- Schmandt, N., Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., Stein, R. A., Bonner, R., Talley, L., ... Chakrapani, S. (2015). A chimeric prokaryotic pentameric ligand-gated channel reveals distinct pathways of activation. *The Journal of General Physiology*, *146*(4), 323–340. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511478>
- Schmauder, R., Kosanic, D., Hovius, R., & Vogel, H. (2011). Correlated optical and electrical single-molecule measurements reveal conformational diffusion from ligand binding to channel gating in the nicotinic acetylcholine receptor. *Chembiochem*, *12*(16), 2431–2434. <https://doi.org/10.1002/cbic.201100302>
- Schmid, R., & Evans, R. J. (2018). ATP-Gated P2X Receptor Channels: Molecular Insights into Functional Roles. *Annual Review of Physiology*, *81*(1). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-020518-114259>
- Schnell, E., Firestein, B. L., El-Husseini, A. E., Brecht, D. S., Aoki, C., Chetkovich, D. M., & Craven, S. E. (2002). Dual Palmitoylation of Psd-95 Mediates Its Vesiculotubular Sorting, Postsynaptic Targeting, and Ion Channel Clustering. *The Journal of Cell Biology*, *148*(1), 159–172. <https://doi.org/10.1083/jcb.148.1.159>
- Scholler, P., Nevoletris, D., Bundel, D. De, Bossi, S., Moreno-delgado, D., Rovira, X., ... Pin, J. (2017). Allosteric nanobodies uncover a role of hippocampal mGlu2 receptor homodimers in contextual fear consolidation. *Nature Communications*, *8*(1967), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01489-1>
- Scott, H., & Panin, V. M. (2014). The role of protein N-glycosylation in neural transmission. *Glycobiology*, *24*(5), 407–417. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwu015>
- Shahsavari, A., Ahring, P. K., Olsen, J. A., Krintel, C., Kastrup, J. S., Balle, T., & Gajhede, M. (2015). Acetylcholine-Binding Protein Engineered to Mimic the 4-4 Binding Pocket in 4-2 Nicotinic Acetylcholine Receptors Reveals Interface Specific Interactions Important for Binding and Activity. *Molecular Pharmacology*, *88*(4), 697–707. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098061>
- Shan, Q., Han, L., & Lynch, J. W. (2011). β Subunit M2–M3 Loop Conformational Changes Are Uncoupled from $\alpha 1$ β Glycine Receptor Channel Gating: Implications for Human Hereditary Hyperekplexia. *PLoS ONE*, *6*(11), e28105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028105>
- Shan, Q., Han, L., & Lynch, J. W. (2012a). Distinct Properties of Glycine Receptor $\beta + \alpha$ -Interface unambiguously characterizing heteromeric interface reconstituted in homomeric protein. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(25), 21244–21252. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337741>
- Shan, Q., Han, L., & Lynch, J. W. (2012b). Function of hyperekplexia-causing $\alpha 1R271Q/L$ glycine receptors is restored by shifting the affected residue out of the allosteric signalling pathway. *British Journal of Pharmacology*, *165*(7), 2113–2123. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01701.x>
- Shapovalov, G., & Lester, H. A. (2004). Gating Transitions in Bacterial Ion Channels Measured at 3 μ s Resolution. *The Journal of General Physiology*, *124*(2), 151–161. <https://doi.org/10.1085/jgp.200409087>
- Shen, X., Fukuda, T., Ohno, K., Sine, S. M., & Engel, A. G. (2008). congenital myasthenia-

related achr delta subunit mutation interferes with intersubunit communication essential for channel gating. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(5).
<https://doi.org/10.1172/JCI34527>.The

- Sinkus, M. L., Graw, S., Freedman, R., Ross, R. G., Lester, H. A., & Leonard, S. (2015). The human CHRNA7 and CHRFA7A genes: A review of the genetics, regulation, and function. *Neuropharmacology*, 96(PB), 274–288.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.02.006>
- Smart, T. G., & Paoletti, P. (2012). Synaptic Neurotransmitter-Gated Receptors. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a009662>
- Smirnova, I., Kasho, V., & Kaback, H. R. (2014). Real-time conformational changes in LacY. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(23), 8440–8445. <https://doi.org/10.1073/pnas.1408374111>
- Soh, M. S., Estrada-Mondragon, A., Durisic, N., Keramidis, A., & Lynch, J. W. (2017). Probing the Structural Mechanism of Partial Agonism in Glycine Receptors Using the Fluorescent Artificial Amino Acid, ANAP. *ACS Chemical Biology*, 12(3), 805–813.
<https://doi.org/10.1021/acschembio.6b00926>
- Sola, M., Bavro, V. N., Timmins, J., Franz, T., Ricard-Blum, S., Schoehn, G., ... Weissenhorn, W. (2004). Structural basis of dynamic glycine receptor clustering by gephyrin. *The EMBO Journal*, 23(13), 2510–2519. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600256>
- Specht, C. G., Grünewald, N., Pascual, O., Rostgaard, N., Schwarz, G., & Triller, A. (2011). Regulation of glycine receptor diffusion properties and gephyrin interactions by protein kinase C. *The EMBO Journal*, 30(18), 3842–3853.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2011.276>
- Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., ... Ulens, C. (2012). Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(44), E3028-34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208208109>
- Talwar, S., & Lynch, J. W. (2014). Phosphorylation mediated structural and functional changes in pentameric ligand-gated ion channels: Implications for drug discovery. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 53C, 218–223.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.05.028>
- Talwar, S., & Lynch, J. W. (2015). Investigating ion channel conformational changes using voltage clamp fluorometry. *Neuropharmacology*, 98, 3–12.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.03.018>
- Taly, A., & Changeux, J.-P. (2008). Functional Organization and Conformational Dynamics of the Nicotinic Receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1132(1), 42–52.
<https://doi.org/10.1196/annals.1405.008>
- Taly, A., Corringer, P.-J., Grutter, T., Prado de Carvalho, L., Karplus, M., & Changeux, J.-P. (2006). Implications of the quaternary twist allosteric model for the physiology and pathology of nicotinic acetylcholine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(45), 16965–16970.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0607477103>

- Taly, A., Delarue, M., Grutter, T., Nilges, M., Le Novère, N., Corringer, P. J., & Changeux, J. P. (2005). Normal mode analysis suggests a quaternary twist model for the nicotinic receptor gating mechanism. *Biophysical Journal*, *88*(6), 3954–3965. <https://doi.org/10.1529/biophysj.104.050229>
- Tasneem, A., Iyer, L. M., Jakobsson, E., & Aravind, L. (2005). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. *Genome Biology*, *6*(1), R4. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-6-1-r4>
- Thompson, A. J., & Lummis, S. C. R. (2006). 5-HT₃ receptors. *Current Pharmaceutical Design*, *12*(28), 3615–3630. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/med.2610100404/abstract>
- Thusius, D., & Vandenburg, B. (1975). The temperature jump relaxation technique. *Biochimie*, *57*(4), 437–443. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(75\)80330-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(75)80330-0)
- Toyoshima, C., & Unwin, N. (1988). Ion channel of acetylcholine receptor reconstructed from images of postsynaptic membranes. *Nature*, *336*(6196), 247–250. <https://doi.org/10.1038/336247a0>
- Tsetlin, V., Kuzmin, D., & Kasheverov, I. (2011). Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *Journal of Neurochemistry*, *116*(5), 734–741. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.07060.x>
- Tsien, R. Y. (2009). Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, *48*(31), 5612–5626. <https://doi.org/10.1002/anie.200901916>
- Ulens, C., Spurny, R., Thompson, A. J., Alqazzaz, M., Debaveye, S., Han, L., ... Lummis, S. C. R. (2014). The prokaryote ligand-gated ion channel ELIC captured in a pore blocker-bound conformation by the Alzheimer's disease drug memantine. *Structure*, *22*(10), 1399–1407. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.013>
- Unwin, N. (2005). Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, *346*(4), 967–989. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.031>
- Van Slyke, A. C., Rezazadeh, S., Snopkowski, M., Shi, P., Allard, C. R., & Claydon, T. W. (2010). Mutations within the S4-S5 linker alter voltage sensor constraints in hERG K⁺ channels. *Biophysical Journal*, *99*(9), 2841–2852. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.08.030>
- Velisetty, P., & Chakrapani, S. (2012). Desensitization mechanism in prokaryotic ligand-gated ion channel. *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(22), 18467–18477. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348045>
- Velisetty, P., Chalamalasetti, S. V., & Chakrapani, S. (2012). Conformational transitions underlying pore opening and desensitization in membrane-embedded *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel (GLIC). *The Journal of Biological Chemistry*, *287*(44), 36864–36872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401067>
- Virkki, L. V., Murer, H., & Forster, I. C. (2006). Voltage Clamp Fluorometric Measurements on a Type II Na⁺-coupled Pⁱ Cotransporter: Shedding Light on Substrate Binding Order. *The Journal of General Physiology*, *127*(5), 539–555.

<https://doi.org/10.1085/jgp.200609496>

- Vullo, S., Bonifacio, G., Roy, S., Johner, N., Bernèche, S., & Kellenberger, S. (2017). Conformational dynamics and role of the acidic pocket in ASIC pH-dependent gating. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(14), 3768–3773. <https://doi.org/10.1073/pnas.1620560114>
- Walsh, R. M., Roh, S. H., Gharpure, A., Morales-Perez, C. L., Teng, J., & Hibbs, R. E. (2018). Structural principles of distinct assemblies of the human $\alpha 4\beta 2$ nicotinic receptor. *Nature*, *557*(7704), 261–265. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0081-7>
- Wang, H. L., Cheng, X., & Sine, S. M. (2012). Intramembrane proton binding site linked to activation of bacterial pentameric ion channel. *Journal of Biological Chemistry*, *287*(9), 6482–6489. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305839>
- Wang, Q., & Lynch, J. W. (2011). Activation and desensitization induce distinct conformational changes at the extracellular-transmembrane domain interface of the glycine receptor. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(44), 38814–38824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.273631>
- Wang, Q., & Lynch, J. W. (2012). A comparison of glycine- and ivermectin-mediated conformational changes in the glycine receptor ligand-binding domain. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *44*(2), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.11.005>
- Wang, Q., Pless, S. A., & Lynch, J. W. (2010). Ligand- and Subunit-specific Conformational Changes in the Ligand-binding Domain and the TM2-TM3 Linker of $\alpha 1 \beta 2 \gamma 2$ GABAA Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(51), 40373–40386. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.161513>
- Weatherill, E. E., & Wallace, M. I. (2015). Combining single-molecule imaging and single-channel electrophysiology. *Journal of Molecular Biology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2014.07.007>
- Wigley, D. B., Clarke, A. R., Dunn, C. R., Barstow, D. A., Atkinson, T., Chia, W. N., ... Holbrook, J. J. (1987). The engineering of a more thermally stable lactate dehydrogenase by reduction of the area of a water-accessible hydrophobic surface. *Biochimica et Biophysica Acta*, *916*, 145–148.
- Wu, Z. S., Cheng, H., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, H. E. (2015). Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: Structures, biology, and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, *36*(8), 895–907. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.66>
- Wulf, M., & Pless, S. A. (2018). High-Sensitivity Fluorometry to Resolve Ion Channel Conformational Dynamics. *Cell Reports*, *22*(6), 1615–1626. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.01.029>
- Xu, Y., & Havenith, M. (2015). Perspective: Watching low-frequency vibrations of water in biomolecular recognition by THz spectroscopy. *Journal of Chemical Physics*, *143*(17). <https://doi.org/10.1063/1.4934504>
- Yamodo, I. H., Chiara, D. C., Cohen, J. B., & Miller, K. W. (2010). Conformational Changes in the Nicotinic Acetylcholine Receptor during. *Biochemistry*, *(49)*, 156–165. <https://doi.org/10.1021/bi901550p>

- Yang, F., Cui, Y., Wang, K., & Zheng, J. (2010). Thermosensitive TRP channel pore turret is part of the temperature activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(15), 7083–7088. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000357107>
- Yao, X., Parnot, C., Deupi, X., Ratnala, V. R. P., Swaminath, G., Farrens, D., & Kobilka, B. (2006). Coupling ligand structure to specific conformational switches in the β 2-adrenoceptor. *Nature Chemical Biology*, *2*(8), 417–422. <https://doi.org/10.1038/nchembio801>
- Yevenes, G. E., & Zeilhofer, H. U. (2011). Allosteric modulation of glycine receptors. *British Journal of Pharmacology*, *164*(2), 224–236. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01471.x>
- Yuan, X., & Xu, Y. (2018). Recent Trends and Applications of Molecular Modeling in GPCR–Ligand Recognition and Structure-Based Drug Design. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(7), 2105. <https://doi.org/10.3390/ijms19072105>
- Zhao, J., & Blunck, R. (2016). The isolated voltage sensing domain of the Shaker potassium channel forms a voltage-gated cation channel. *ELife*, *5*(OCTOBER2016), 1–18. <https://doi.org/10.7554/eLife.18130>
- Zheng, J., & Zagotta, W. N. (2000). Gating Rearrangements in Cyclic Nucleotide-Gated Channels Revealed by Patch-Clamp Fluorometry. *Neuron*, *28*(2), 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00117-3)
- Zhu, S., Noviello, C. M., Teng, J., Walsh, R. M., Kim, J. J., & Hibbs, R. E. (2018). Structure of a human synaptic GABA A receptor. *Nature*, *559*(7712), 67–88. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0255-3>
- Zhu, W., Varga, Z., & Silva, J. R. (2016). Molecular motions that shape the cardiac action potential: Insights from voltage clamp fluorometry. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *120*(1–3), 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.12.003>
- Zimmermann, I., & Dutzler, R. (2011). Ligand activation of the Prokaryotic Pentameric ligand-gated ion channel ELIC. *PLoS Biology*, *9*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001101>
- Zimmermann, I., Marabelli, A., Bertozzi, C., Sivilotti, L. G., & Dutzler, R. (2012). Inhibition of the Prokaryotic Pentameric Ligand-Gated Ion Channel ELIC by Divalent Cations. *PLoS Biology*, *10*(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001429>
- Zouridakis, M., Giastas, P., Zarkadas, E., Chroni-Tzartou, D., Bregestovski, P., & Tzartos, S. J. (2014). Crystal structures of free and antagonist-bound states of human α 9 nicotinic receptor extracellular domain. *Nature Structural and Molecular Biology*, *21*(11), 976–980. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2900>

Liste des publications

Menny A, **Lefebvre SN**, Schmidpeter PA, Drège E, Fourati Z, Delarue M, Edelstein SJ, Nimigean CM, Joseph D, Corringer PJ. 2017. Identification of a pre-active conformation of a pentameric channel receptor. *Elife*. doi: 10.7554/eLife.23955.

Ruan Y, Kao K, **Lefebvre S**, Marchesi A, Corringer PJ, Hite RK, Scheuring S. 2018. Structural titration of receptor ion channel GLIC gating by HS-AFM. *PNAS*. doi: 10.1073/pnas.1805621115

Polovinkin L, Perot J, Neumann E, Jensen AA, **Lefebvre SN**, Corringer PJ, Nury H. 2018. Conformational transitions of the serotonin 5-HT 3 receptor. *Nature*. doi: 10.1038/s41586-018-0672-3