



HAL
open science

Etudes structurales de quelques protéines membranaires

Hugues Nury

► **To cite this version:**

Hugues Nury. Etudes structurales de quelques protéines membranaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Grenoble Alpes, 2021. <tel-04935561>

HAL Id: tel-04935561

<https://theses.hal.science/tel-04935561v1>

Submitted on 7 Feb 2025

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.



HAL Authorization

Université Grenoble Alpes
UFR de Chimie et Biologie

Habilitation à Diriger des Recherches

Etudes structurales de quelques protéines membranaires

Soutenue le 29 juin 2021

par

Dr. Hugues NURY
Institut de Biologie Structurale

Jury

Dr. Martin Picard, rapporteur

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris, France

Dr. Guillaume Lebon, rapporteur

Institut de Génomique Fonctionnelle, Montpellier, France

Dr. Thomas Grutter, rapporteur

Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Illkirch, France

Prof. Lucie Delemotte, examinatrice

Science for Life Laboratory, Stockholm, Suède

Prof. Franck Fieschi, examinateur

Institut de Biologie Structurale, Grenoble, France

Remerciements

Je suis tout d'abord très reconnaissant envers les membres du jury, qui ont bien voulu utiliser leur temps pour évaluer mon travail. Merci Lucie, Franck, Thomas, Guillaume et Martin. J'espère que le document écrit n'est pas trop indigeste/gent et que la soutenance permettra des discussions intéressantes.

Je remercie collègues passés et présents du laboratoire, et en premier lieu celles et ceux qui ont réalisé les expériences décrites. Merci donc aux deux extraordinaires techniciennes de l'équipe, Delphine et Céline, et aux incroyables postdocs actuels, Letteris et Uriel. Merci Jo, Sonja, Lucie, Orso, Florine, Yusuf, Charlotte, aux côtés de qui j'ai travaillé quelques mois ou quelques années.

Je mesure combien je dois à Eva, Pierre-Jean, Marc dans les labos desquels je me suis formé, et à qui me lie un sentiment de filiation scientifique. Je suis reconnaissant envers Horst, Cédric et Ghérici en compagnie desquels j'ai fait mes premières armes avec le récepteur 5-HT3. Guy a une importance cruciale comme passeur de la microscopie électronique auprès de moi et de notre équipe entière. Les collaborations avec François, Chris et John, essentielles, sont aussi faciles et accompagnées par du respect et de l'amitié. Avec Jacques, nous avons partagé bureau, discussions et préoccupations quotidiennes ou non, scientifiques ou non. C'était génial, et ça va beaucoup me manquer, merci !



De gauche à droite Florine, Nancy, Delphine, Uriel, Jacques, Letteris



De gauche à droite Letteris, Jo, Céline, Hugues, Florine, Eva, Delphine, Jacques, Uriel

Structure du document

Après un curriculum vitae, ce mémoire présente brièvement mes travaux passés, les recherches en cours et les projets de recherche. Ceux-ci sont répartis entre :

- un premier court chapitre consacré aux méthodes, et surtout centré sur l'expression des protéines ;
- les deuxième et troisièmes chapitres dédiés aux récepteurs canaux-pentamériques ;
- et enfin un quatrième court chapitre abordant les canaux à deux domaines pores.

Lorsqu'il s'agit de travaux passés, une mise en contexte précède l'insertion des publications correspondantes (ou de leur première page seulement, lorsque ces publications sont plus éloignées de mes préoccupations actuelles).

Le lecteur me pardonnera j'espère l'aspect patchwork si ce n'est décousu du document. Il est également émaillé d'anecdotes, qui j'espère n'apparaîtront pas inadaptées dans un mémoire d'HDR : puisque les résultats scientifiques se trouvent dans les publications jointes, le reste du texte fait de temps à autre un pas de côté.

Table des matières

Un code couleur permet une orientation rapide entre travaux **passés**, **en cours** et **futurs**.

Curriculum Vitae	5
Formation	5
Expérience professionnelle	5
Financements, distinctions	5
Encadrement	5
Actions collectives	6
Principales collaborations	6
Production scientifique	6
Publications	7
Synthèse chronologique des travaux de recherche	9
Methodes	11
Expression des protéines	11
Lignées stables inductibles de cellules mammifères	11
Cellules d'insectes et baculovirus	12
Développements en cours	13
Microscopie électronique	16
Enregistrement des données	16
Orientations préférentielles	16
Traitement des données	19
Les récepteurs 5-HT3 de la sérotonine	21
La famille des récepteurs-canaux pentamériques	21
Sous-unités et assemblage des récepteurs 5-HT3	21
Distribution	21
Architecture	22
Mécanisme moléculaire du gating et du transport ionique	24
Pharmacologie structurale : les antiémétiques	26

Pharmacologie structurale : l'antidépresseur vortioxétine	27
Le récepteur 5-HT ₃ , rôles exotiques	29
Autres récepteurs-canaux pentamériques	31
GLIC	31
ELIC	33
Récepteurs nicotiques de l'acétylcholine $\alpha 9\alpha 10$	34
Le récepteur nicotinique musculaire	36
Purification	36
Structures obtenues	37
Les récepteurs nicotiques d'insectes	38
Canaux potassium à deux domaines pores	40
De l'expression à la cristallisation de TREK1	41
Hétéromères TREK1-TREK2	41
Meilleures données cryoEM à ce jour	43
Des premières tentatives décevantes avec un fragment d'anticorps	45
Un canal homologue chez les plantes ne peut pas adopter un "domain-swap"	46
Bibliographie	48

Curriculum Vitae

Né en 1980, deux enfants de 4 et 8 ans

Chargé de Recherche (CRCN CNRS, section 20)

Institut de Biologie Structurale (UMR 5075 CNRS/CEA/UGA)

71 avenue des Martyrs, CS 10090, 38044 Grenoble Cedex 9

Formation

2000-2003	Ecole Centrale Paris
2003	DEA, Biophysique Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, Paris
2007	Thèse en Biologie Structurale, Université Joseph Fourier, Grenoble Évaluée par B. Miroux, E. Kunji, I. Sinning and M. Le Maire

Expérience professionnelle

2003-2007	Thèse : Etudes structurales du transporteur mitochondrial d'ADP-ATP Sous la direction de E. Pebay-Peyroula, IBS
2008-2010	Post-doctorat : Structure des récepteurs-canaux Cys-loop bactériens Laboratoires de P.J. Corringer et M. Delarue, Institut Pasteur
2010-2013	Post-doctorat : Structure du récepteur-canal 5-HT ₃ de souris Laboratoire of H. Vogel, EPFL, Suisse
Depuis 2013	Chargé de recherche au CNRS à l'IBS Structure, mécanisme, transitions des récepteurs-canaux pentamériques

Financements, distinctions

2011 - Bourse post-doctorale EMBO

2011 - Prix 'Les grandes avancées françaises en biologie' de l'Académie des Sciences

2012 - Bourse post-doctorale HFSP

2014 - Bourse doctorale CEA pour Lucie Polovinkin

2014 - Marie Curie Career installation grant (100 k€ pour quatre ans)

2014 - Université Grenoble-Alpes bourse AGIR (10 k€ pour deux ans)

2014 - Collaboration industrielle (540 k€ en cumulé pour trois ans)

2015 - ERC Starting Grant (début en juin 2015, 1.5 M€ pour 6 ans)

2015 - Prix Paoletti du CNRS

2018 - Univ. Grenoble Alpes Bourse pour inviter JE Baenziger en congé sabbatique

2018 - FRM Bourse postdoctorale de 3 ans pour Uriel Lopez Sanchez

2021 - Bourse doctorale CEA

Encadrement

Avant recrutement au CNRS

- 2009-2010 - Frédéric Poitevin, doctorant de Marc Delarue (15%), dynamique conformationnelle du récepteur-canal GLIC
- 2011-2013 - Cédric Deluz, technicien, production du récepteur 5-HT₃

Au CNRS

- 2013-2016 - Aleksandra Woznicka, doctorante de Stéphanie Ravaud (15%), études des transporteurs mitochondriaux d'ADP-ATP

- 2014-2017 - Lucie Polovinkin, doctorante, transitions conformationnelles des récepteurs 5-HT3
- 2014-2016 - Orso Subrini, postdoctorant, études structurales du canal TREK1
- 2015-2019 - Jonathan Perot, ingénieur, études structurales des récepteurs canaux
- Depuis 2016 - Céline Juillan-Binard, technicienne, études structurales du canal TREK1-TREK2, expression en cellules d'insectes
- Depuis 2019 - Delphine Baud, technicienne (30%), expression de protéines membranaires en cellules mammifères
- Depuis 2018 - Lefferis Zarkadas, postdoctorant, récepteurs nicotiques de l'acétylcholine
- Depuis 2019 - Uriel Lopez-Sanchez, postdoctorant, conformations du récepteur 5-HT3

Notre équipe accueille également des stagiaires à tous les stades de leurs études.

Je suis responsable depuis septembre 2019 d'une équipe qui comprend deux autres chercheurs: Eva Pebay-Peyroula (professeur émérite UGA) et Jacques Neyton (directeur de recherche CNRS). Nous travaillons ensemble, Jacques étant impliqué de près dans mes projets tandis qu'avec Eva nous avons plutôt des discussions sur nos projets respectifs. Florine Dupeux, détachée auprès de la plate-forme de cristallisation de l'EMBL, est rattachée administrativement à l'équipe.

Je suis également responsable du groupe Transport membranaire, qui comprend quatre équipes : celles de Valentin Gordeliy, de Michel Vivaudou, de Christophe Moreau, et la mienne. Il s'agit d'un rôle administratif et de représentation de nos intérêts communs auprès de l'IBS. De plus, à la fin de l'année, l'équipe de Christophe et la mienne occuperont des espaces communs de bureaux et laboratoires

Actions collectives

- 2014, 2017 - Organisation de l'Ecole 'Integrated Structural Cell Biology' de 4 semaines en juillet 2014, de 2 semaines en mars 2017, à l'Ecole de Physique des Houches (~50 participants dans les deux cas).
- 2017 - Conférence dédiée à la cryo-microscopie électronique, 6 et 7 juillet 2017, à l'occasion de l'implantation d'un microscope Krios sur le campus.
- Depuis 2019 - Membre du conseil scientifique du Labex GRAL
- Expertise régulière de projets et publications

Principales collaborations

- Equipe de Guy Schoehn (IBS) pour la microscopie électronique. C'est une collaboration essentielle pour tous nos projets.
- Equipe de John Baenziger (U. Ottawa) pour les récepteurs nicotiques du poisson torpille
- Equipe de Anders Kristensen (U. Copenhagen) pour l'étude de la vortioxetine, un antidépresseur visant le récepteur 5-HT3.
- Equipe de Francois Dehez et Christophe Chipot (CNRS Nancy) pour la simulation de toutes nos structures

Production scientifique

J'ai publié 16 articles de recherche, dont 6 comme premier auteur et 4 comme dernier auteur. J'ai aussi participé à 4 revues et 3 chapitres de livre.

Avant l'épidémie de COVID-19, je me rendais en moyenne à 1-2 conférences par an, et je donnais 1-4 séminaires dans d'autres laboratoires, pour un total de 28 communications orales et 8 posters.

Publications

Les publications apparaissent de la plus récente à la plus ancienne. Les [revues](#) et [chapitres de livre](#) sont en couleur.

1. Barnes, N. M., Ahern, G. P., Becamel, C., Bockaert, J., Camilleri, M., Chaumont-Dubel, S., Claeysen, S., Cunningham, K. A., Fone, K. C., Gershon, M., Di Giovanni, G., Goodfellow, N. M., Halberstadt, A. L., Hartley, R. M., Hassaine, G., Herrick-Davis, K., Hovius, R., Lacivita, E., Lambe, E. K., Leopoldo, M., Levy, F. O., Lummis, S. C. R., Marin, P., Maroteaux, L., McCreary, A. C., Nelson, D. L., Neumaier, J. F., Newman-Tancredi, A., Nury, H., Roberts, A., Roth, B. L., Roumier, A., Sanger, G. J., Teitler, M., Sharp, T., Villalón, C. M., Vogel, H., Watts, S. W., and Hoyer, D. (2021) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function. *Pharmacol. Rev.* **73**, 310–520

2. Uchański, T., Masiulis, S., Fischer, B., Kalichuk, V., López-Sánchez, U., Zarkadas, E., Weckener, M., Sente, A., Ward, P., Wohlkönig, A., Zögg, T., Remaut, H., Naismith, J. H., Nury, H., Vranken, W., Aricescu, A. R., Pardon, E., and Steyaert, J. (2021) Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **18**, 60–68

3. Zarkadas, E., Zhang, H., Cai, W., Effantin, G., Perot, J., Neyton, J., Chipot, C., Schoehn, G., Dehez, F., and Nury, H. (2020) The Binding of Palonosetron and Other Antiemetic Drugs to the Serotonin 5-HT₃ Receptor. *Structure* **28**, 1131–1140.e4

4. Hénault, C. M., Govaerts, C., Spurny, R., Brams, M., Estrada-Mondragon, A., Lynch, J., Bertrand, D., Pardon, E., Evans, G. L., Woods, K., Elberson, B. W., Cuello, L. G., Brannigan, G., Nury, H., Steyaert, J., Baenziger, J. E., and Ulens, C. (2019) A lipid site shapes the agonist response of a pentameric ligand-gated ion channel. *Nat. Chem. Biol.* **15**, 1156–1164

5. Polovinkin, L., Hassaine, G., Perot, J., Neumann, E., Jensen, A. A., Lefebvre, S. N., Corringer, P.-J., Neyton, J., Chipot, C., Dehez, F., Schoehn, G., and Nury, H. (2018) Conformational transitions of the serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* **563**, 275–279

6. Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Hovius, R., Stahlberg, H., Tomizaki, T., Desmyter, A., Moreau, C., Peclinovska, L., Minniberger, S., Mebarki, L., Li, X.-D., Vogel, H., and Nury, H. (2017) Expression, Biochemistry, and Stabilization with Camel Antibodies of Membrane Proteins: Case Study of the Mouse 5-HT₃ Receptor. *Methods Mol. Biol.* **1635**, 139–168

7. Hassaine, G., Deluz, C., Grasso, L., Wyss, R., Tol, M. B., Hovius, R., Graff, A., Stahlberg, H., Tomizaki, T., Desmyter, A., Moreau, C., Li, X.-D., Poitevin, F., Vogel, H., and Nury, H. (2014) X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* **512**, 276–281

8. Hassaine, G., Deluz, C., Tol, M. B., Li, X.-D., Graff, A., Vogel, H., and Nury, H. (2013) Large scale expression and purification of the mouse 5-HT₃ receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2544–2552

9. Roy, A. L., Le Roy, A., Nury, H., Wiseman, B., Sarwan, J., Jault, J.-M., and Ebel, C. (2013) Sedimentation Velocity Analytical Ultracentrifugation in Hydrogenated and Deuterated Solvents for the Characterization of Membrane Proteins. *Methods in Molecular Biology* 219–251

10. Prevost, M. S., Sauguet, L., Nury, H., Van Renterghem, C., Huon, C., Poitevin, F., Baaden, M., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2012) A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 642–649

11. Spurny, R., Ramerstorfer, J., Price, K., Brams, M., Ernst, M., Nury, H., Verheij, M., Legrand, P., Bertrand, D., Bertrand, S., Dougherty, D. A., de Esch, I. J. P., Corringer, P.-J., Sieghart, W., Lummis, S. C. R., and Ulens, C. (2012) Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E3028–E3034
12. Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J.-P., Sonner, J. M., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2011) X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431
13. Nury, H., Poitevin, F., Van Renterghem, C., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010) One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6275–6280
14. Corringer, P.-J., Baaden, M., Bocquet, N., Delarue, M., Dufresne, V., Nury, H., Prevost, M., and Van Renterghem, C. (2010) Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J. Physiol.* **588**, 565–572
15. Nury, H., Blesneac, I., Ravaud, S., and Pebay-Peyroula, E. (2010) Structural approaches of the mitochondrial carrier family. *Methods Mol. Biol.* **654**, 105–117
16. Nury, H., Bocquet, N., Le Poupon, C., Raynal, B., Haouz, A., Corringer, P.-J., and Delarue, M. (2010) Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel. *J. Mol. Biol.* **395**, 1114–1127
17. Boesecke, P., Bois, J. M., Crépin, T., Hunte, C., Kahn, R., Kao, W. C., Nauton, L., Winther, A. M. L., Moller, J., Nissen, P., Nury, H., Olesen, C., Pebay-Peyroula, E., Vicat, J., and Stuhmann, H. (2009) A first low-resolution difference Fourier map of phosphorus in a membrane protein from near-edge anomalous diffraction. *J. Synchrotron Radiat.* **16**, 658–665
18. Bocquet, N., Nury, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111–114
19. Nury, H., Manon, F., Arnou, B., le Maire, M., Pebay-Peyroula, E., and Ebel, C. (2008) Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also forms multimeric species. *Biochemistry* **47**, 12319–12331
20. Dahout-Gonzalez, C., Nury, H., Trézéguet, V., Lauquin, G. J.-M., Pebay-Peyroula, E., and Brandolin, G. (2006) Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Physiology* **21**, 242–249
21. Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G. J. M., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 713–741
22. Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trézéguet, V., Lauquin, G., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2005) Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers. *FEBS Lett.* **579**, 6031–6036
23. Biou, V., Bösecke, P., Bois, J. M., Brandolin, G., Kahn, R., Mas, C., Nauton, L., Nury, H., Pebay-Peyroula, E., Vicat, J., and Stuhmann, H. (2005) X-ray spectroscopy and X-ray diffraction at wavelengths near the K-absorption edge of phosphorus. *J. Synchrotron Radiat.* **12**, 402–

Synthèse chronologique des travaux de recherche

Depuis ma thèse commencée en 2003 jusqu'à aujourd'hui, je travaille dans le domaine de la biologie structurale des protéines membranaires, dans l'idée de décrire, voire de comprendre, les déterminants moléculaires de certains processus biologiques de transport. Un noyau commun de questions pratiques traverse ces années : comment obtenir assez de protéine, comment l'isoler sans l'abîmer ? Comment diable parvenir à une structure de qualité ? Comment regarder et interroger cette structure, que nous dit-elle ? Comment décrire une transition entre conformations, la comparer à d'autres ? Au rythme de ces questions, mes activités ont oscillé de la biochimie à la cristallographie, de la culture cellulaire à la biophysique, et ces derniers temps de la microscopie électronique à la rédaction ou l'administration.

J'ai effectué mon stage de master et mon doctorat sous la direction d'Eva Pebay-Peyroula à l'Institut de Biologie Structurale (IBS). A mon arrivée au laboratoire, elle venait de déterminer la structure cristalline du transporteur mitochondrial ADP-ATP (AAC), en collaboration avec l'équipe de Gérard Brandolin (Pebay-Peyroula *et al.*, 2003). Cette protéine est le membre le plus étudié de la famille des transporteurs mitochondriaux (~60 membres chez l'homme) qui fait entrer et sortir de petites molécules de la mitochondrie (Dahout-Gonzalez *et al.*, 2006; Nury *et al.*, 2006). Au cours de mon doctorat, j'ai décrit les interactions entre l'AAC et les lipides qui l'entourent, en obtenant une nouvelle forme cristalline de l'AAC, dans laquelle 3 molécules de cardiolipine enveloppent la surface hydrophobe de la protéine (Nury *et al.*, 2005). Nous avons par ailleurs effectué des études en solution utilisant l'ultracentrifugation analytique, la chromatographie d'exclusion de taille (SEC), la diffusion de neutrons aux petits angles, pour démontrer que l'AAC était monomérique une fois solubilisé (Nury *et al.*, 2008) — apportant ainsi une contribution à un débat qui perdure (Senoo *et al.*, 2020). Enfin, l'objectif initial, ambitieux, de cristalliser l'AAC dans une autre conformation n'a pas été atteint. Cette seconde conformation a finalement été capturée... une douzaine d'années plus tard (Ruprecht *et al.*, 2019).

Mes travaux de thèse ne sont pas abordés plus avant ici.

J'ai rejoint les groupes de Pierre-Jean Corringer et Marc Delarue à l'Institut Pasteur en 2008, dans le but d'étudier la structure d'un récepteur-canal pentamérique (pLGIC). Ces protéines membranaires jouent un rôle crucial dans la transduction rapide du signal chimio-électrique au niveau des synapses et sont d'importantes cibles de médicaments (antidépresseurs, drogues d'abus, anesthésiques, etc...). En 2007, aucune structure à haute résolution de récepteur entier n'était disponible, et j'ai eu la chance d'arriver au bon endroit au bon moment. L'endroit, à cheval entre deux laboratoires complémentaires qui collaboraient étroitement; et le moment, celui du début de l'exploitation structurale du récepteur-canal procaryote GLIC (Tasneem *et al.*, 2005; Bocquet *et al.*, 2006), ont permis une fructueuse moisson de résultats en trois ans.

Ces travaux sont décrits page 31 et suivantes.

En 2010, dans une expatriation toute relative, j'ai rejoint le laboratoire de Horst Vogel à l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Seul structuraliste dans un environnement tourné vers la biophysique et les microscopies de fluorescence, j'étais désireux d'ajouter des cordes à mon arc, quitte à m'éloigner pour un temps de la biologie structurale. Mais, hasard des expériences qui échouent ou fonctionnent, et/ou habile orientation de la part de Horst, j'ai fini par me concentrer sur un projet visant à obtenir la première structure d'un pLGIC de mammifère, le récepteur 5-HT3 de la sérotonine. Au passage, j'ai appris l'usage d'outils qui ont largement servi par la suite (expression à grande échelle dans des cellules eucaryotes — d'insectes ou de mammifères — préparation de liposomes, utilisation d'anticorps de lama, et des notions d'électrophysiologie). Nous avons mis au point et optimisé l'expression du récepteur 5-HT3 murin, en cellules HEK, CHO et en cellules S2. Différentes méthodes de cultures, manières de délivrer l'ADN du gène d'intérêt aux cellules, ont été explorées. Après purification et une protéolyse limitée permettant de se débarrasser du domaine désordonné du récepteur, des mois puis des

années de cristallisation ont échoué à produire des cristaux de qualité (Hassaine *et al.*, 2013). Mi-2013, à moitié de retour en France, le criblage fonctionnel d'une bibliothèque de nanobodies ciblant le récepteur permet de sélectionner un nanobody inhibiteur de haute affinité, dont le complexe donna de beaux cristaux, diffractant les rayons X jusqu'à une résolution de 3.5 Å. La conformation obtenue révéla l'agencement du site de liaison de la sérotonine, la géométrie du pore, l'architecture du vestibule intracellulaire (Hassaine *et al.*, 2014).

Intégré dans l'équipe d'Eva Pebay-Peyroula et de Stéphanie Ravaud, j'ai eu la chance de bénéficier d'un environnement humain et matériel favorable. Sur la lancée de la première structure du récepteur 5-HT₃, déterminante dans l'obtention de mes premiers financements, nous avons tenté de capturer d'autres conformations pour décrire le cycle fonctionnel du récepteur dans son entier. A partir de 2014, j'ai passé du temps avec Guy Schoehn, à apprendre la microscopie électronique qui s'est imposée comme la méthode structurale adaptée aux assez grosses protéines membranaires. En 2017, Jacques Neyton a rejoint notre équipe, y a implanté l'électrophysiologie en ovocytes de Xénope. L'utilisation conjointe de ces deux techniques nous a permis de décrire trois états conformationnels du récepteur 5-HT₃, en apportant un faisceau de preuves expérimentales pour les attribuer à des états physiologiques (inhibé, pré-actif, ouvert). Nos expériences de SCAM et de VCF ont indiqué en effet que la porte se fermant dans l'état désensibilisé se situe probablement en bas du pore ; et donc que la structure liée à la sérotonine avec le pore fermé en haut correspond à un état préactif (Polovinkin *et al.*, 2018). Cette étude, qui comprend également des simulations et de la mutagenèse pour localiser un modulateur allostérique membranaire, est la plus intégrée que j'ai menée à ce jour.

Nous avons également exploré la pharmacologie des récepteurs 5-HT₃, en déterminant la structure du complexe avec le palonosetron (Zarkadas *et al.*, 2020), le plus puissant des antiémétiques, et avec la vortioxetine, un antidépresseur récemment arrivé sur le marché (manuscrit en préparation).

Tous les travaux relatifs au récepteur 5-HT₃ sont regroupés dans un chapitre commençant page 21.

Je me suis intéressé à quelques autres récepteurs de la famille pLGICs, et j'évoque très brièvement les résultats obtenus avec le récepteur nicotinique du poisson Torpille, page 36, et avec les récepteurs nicotiques $\alpha 9\alpha 10$, page 34.

Je mène également un projet secondaire, qui s'intéresse aux canaux potassium à deux domaines pore (K₂P). Initié en collaboration avec une entreprise pharmaceutique venue chercher dans l'équipe le savoir-faire en expression et cristallisation de canaux, ce projet a permis d'exprimer, purifier et reconstituer en nanodisques les canaux TREK1, TREK2 et l'hétérodimère possédant les deux sous-unités. Au moment d'écrire ce document, nous buttons sur la phase finale : faire passer la résolution des reconstructions 3D de 6 Å à 3 Å grâce à des meilleures données de microscopie électronique. Ces recherches sont décrites à partir de la page 40.

Methodes

Expression des protéines

Les deux premières protéines membranaires que j'ai manipulées furent toutes deux des protéines naturellement abondantes, isolées depuis leurs membranes natives (la bactériorhodopsine et le transporteur mitochondrial d'ADP). J'ai ensuite cultivé assez de litres de *E. Coli* sur-exprimant le récepteur-canal GLIC pour que l'odeur dérange tout l'étage du bâtiment de neuroscience de Pasteur, une fois chaque semaine. Depuis 2010, toutes les protéines dont je souhaite étudier la structure sont exprimées en cellules eucaryotes, cellules Sf9 et HEK pour l'essentiel. Je ne parle ici que de ces dernières, et de deux manières d'y apporter les transgènes que l'on souhaite exprimer: création de lignées stables, utilisation de vecteurs viraux.

Lignées stables inductibles de cellules mammifères

Dans le laboratoire de Horst Vogel à l'EPFL, Gherici Hassaine (un postdoc) et Cédric Deluz (un technicien) travaillaient sur l'expression du récepteur 5-HT3 depuis quelques années. Ils avaient atteint un point où de petites quantités de protéines pures étaient disponibles. Petit à petit, tous les trois, nous avons appris à augmenter les quantités et les rendements de l'expression, nous avons rendu la purification reproductible, nous avons caractérisé en détail nos échantillons de récepteurs et développé des nanobodies. La publication sur l'expression et la purification du récepteur fut ma première en tant que dernier auteur (Hassaine *et al.*, 2013). Elle décrit la création d'une lignée cellulaire stable avec un système inductible dans lequel l'expression de la protéine est réprimée en l'absence — et induite en présence — de tétracycline, atteignant généralement 10×10^6 récepteurs par cellule. Les cellules, cultivées en suspension sous agitation orbitale, atteignent une densité de 3×10^6 cellules/mL. Ce système fournit une protéine abondante (typiquement 7 mg/L de culture avant purification) à un coût raisonnable (environ 100 euros/L) pour commencer la purification. La purification par affinité aboutit à une protéine pure et active. Deux traitements enzymatiques, la déglycosylation et l'élimination de l'étiquette de purification, conduisent à un récepteur pentamérique après chromatographie d'exclusion de taille, à l'échelle du milligramme. Cet échantillon, adapté à la cristallographie, a donné des cristaux qui diffractent les rayons X à faible résolution.

La publication :

Hassaine, G., Deluz, C., Tol, M. B., Li, X.-D., Graff, A., Vogel, H., and Nury, H. (2013) Large scale expression and purification of the mouse 5-HT3 receptor. *Biochim. Biophys. Acta* **1828**, 2544–2552

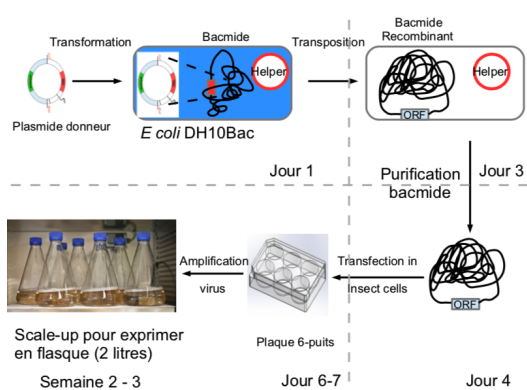
est reproduite ci-après.

Aujourd'hui encore, nous cultivons régulièrement cette lignée cellulaire, et je reste convaincu des avantages du système inductible. Une mise à jour des protocoles, complétée par un ensemble de méthodes pour la caractérisation de nanobodies, a été publiée sous la forme d'un chapitre de livre en 2017 (Hassaine *et al.*, 2017). Cette publication n'est pas reproduite ici.

Par ailleurs, nous avons également souvent utilisé la transfection transitoire, en présence d'un agent transfectant peu coûteux — le PEI — pour des productions de protéines à l'échelle du litre... et souvent observé des rendements variables !

Cellules d'insectes et baculovirus

Nous avons commencé l'expression en cellules d'insectes grâce à Orso Subrini en 2015. Il connaissait un peu ce système avant d'arriver, a acquis une formation complémentaire via la plateforme d'expression de l'EMBL, puis a implanté dans notre équipe tout le savoir-faire nécessaire. C'est pour le canal potassique TREK que le besoin s'est fait sentir : en effet l'homologue le plus proche de TREK1, que nous cherchions à cristalliser, venait de voir sa structure résolue en 2015, à partir de protéine produite en cellules d'insectes (Dong *et al.*, 2015).



L'expression en cellule d'insecte présente plusieurs avantages : le milieu n'est pas trop cher (comparé à celui des cellules HEK en suspension), le clonage ne sont pas trop pénibles (comparé aux gros vecteurs lentiviraux), on peut faire un certains nombres d'essais en parallèle (exemple ci-dessous) et surtout cela fonctionne dans de nombreux cas — d'ailleurs la majeure partie des protéines membranaires eucaryotes de structure connue sont produites de cette façon. Cependant le temps qui sépare le clonage du premier Western blot est sensiblement plus long qu'en transfection transitoire. Le schéma ci-contre

rappelle les principales étapes, du plasmide contenant le gène d'intérêt à la culture de cellules infectées à l'échelle du litre. J'illustre ce système d'expression au travers l'exemple de TREK1, mais les cellules d'insectes nous ont permis d'exprimer une gamme de protéines diverses au cours des années : un transporteur de phosphate de *Toxoplasma gondii* (projet de Eva Pebay-Peyroula), plusieurs autres canaux de la même famille que TREK1, et même un Fab, une protéine d'un virus de la pomme de terre...

Au début du projet sur TREK1, nous souhaitions évaluer rapidement où tronquer la protéine du côté C-terminal (Figure 1). Nous avons généré systématiquement des constructions de plus en plus courtes, amputées d'une région prédite sans structure secondaire. Ces constructions ont été placées dans un vecteur dérivé de pFastBac, portant une GFP, une étiquette de purification histidine et un site de coupure TEV en aval du site de sous-clonage. L'expression d'une dizaine de constructions à petite échelle a permis de réaliser des profils de chromatographie d'exclusion de taille sur extraits membranaires solubilisés, avec une détection de la fluorescence de la GFP (FSEC). Ces expériences nous ont guidé en peu de temps vers les deux constructions à garder (A et B, il n'y avait plus de signal suffisant pour les constructions C et plus longues).

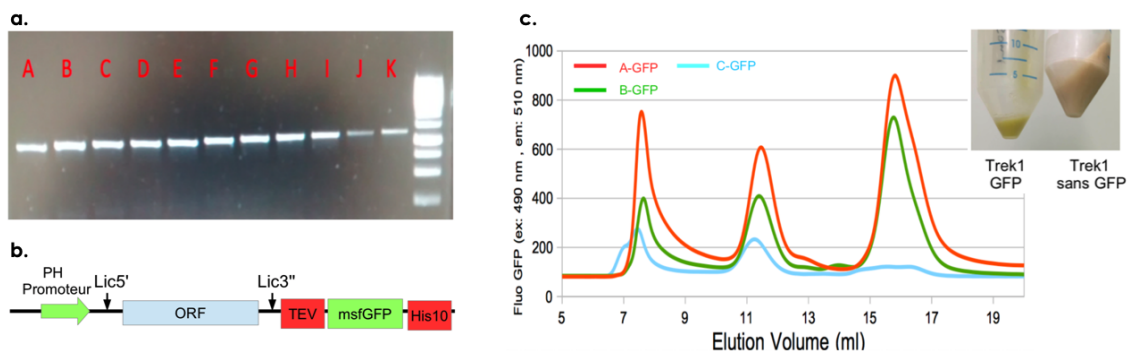


Figure 1. Exemple d'utilisation des cellules d'insectes pour l'évaluation rapide d'une dizaine de constructions.
a. 11 constructions portant des coupures incrémentales du C-terminal de TREK1 ont été réalisées, la figure montre un gel d'électrophorèse des produits PCR. **b.** Ces constructions ont été insérées dans des plasmides pFastBac permettant une fusion C-terminale avec la GFP. **c.** L'expression d'environ 10 mL de culture permet de mesurer des profils FSEC, ici montrés pour les constructions A, B et C et ainsi d'évaluer l'expression de l'oligomère souhaité de la protéine d'intérêt (le pic à 12 mL, celui de gauche correspondant aux agrégats et celui de droite à la GFP seule provenant de protéolyse).

Développements en cours

La manière dont nous exprimons, dans notre laboratoire, les protéines d'intérêts va continuer d'évoluer. Je veux citer ici deux exemples d'évolutions en cours. Tout d'abord nous sommes parfois amenés à utiliser d'autres lignées cellulaires que des cellules HEK ou Sf9/Sf21 usuelles. Au cours des premiers mois de la crise du COVID-19, nous avons produit plusieurs constructions du domaine soluble de la protéine ACE2 afin d'aider des collègues de l'IBS. Cette protéine est sécrétée dans le milieu extracellulaire, et Delphine Baud a transfecté à la fois nos habituelles HEK-F et des cellules ExpiHEK, réputées pour leur rendement en sécrétion mais dont le prix du milieu de culture nous avait jusqu'ici paru prohibitif.

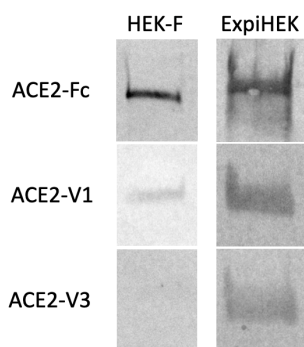


Figure 2. Rendement de l'expression du domaine soluble de ACE2 en cellules HEK-F et ExpiHEK. 35 μ L de milieu de culture de cellules transfectées, à 96h, ont été utilisées pour un western blot révélé avec un anticorps dirigé contre l'étiquette histidine de 3 constructions différentes. Dans les 3 cas, le rendement est bien meilleur avec les cellules ExpiHEK.

Les rendements obtenus furent convaincants: les ExpiHEK produisirent de l'ordre de 400-500 μ g pour les constructions ACE2-V1 et ACE2-Fc à l'échelle de 30 mL de culture. Des cultures de 100 mL (rappelons que pour l'expression de nos protéines membranaires, nous travaillons plutôt à l'échelle de 2-6 litres) permirent ensuite de purifier assez d'ACE2 pour nos collègues, qui

tentent de développer un capteur du SARS-CoV-2 dans l'air ambiant. Nous avons ensuite utilisé la lignée ExpiHEK pour la production d'un domaine viral sécrété se liant au transporteur XPR1 ; pour un test de production du récepteur membranaire 5-HT3A dans le but de peser le gain d'expression au regard du surcoût financier (dans ce dernier cas, le résultat n'est pas convaincant).

Une évolution moins anecdotique tient à la manière de faire pénétrer l'ADN du (ou des) gène(s) d'intérêt(s) dans les cellules. Il y a quelques années, on disait volontiers que la frontière de la biologie structurale se trouvait du côté des protéines membranaires et des grands complexes ; et une des difficultés pour ces derniers était de disposer d'un système permettant l'expression simultanée de nombreuses sous-unités. Aujourd'hui, la nécessité d'exprimer simultanément plusieurs sous-unités peut aussi s'appliquer à des projets membranaires. Les récepteurs

nicotiniques d'insectes, par exemple, peuvent comporter 3 ou 4 types de sous-unités et requièrent 3 chaperonnes différentes (Ihara *et al.*, 2020; Rufener *et al.*, 2020).

Le développement de systèmes comme le MultiBac (Bieniossek *et al.*, 2012), et de versions plus récentes comme le BigBac (Weissmann *et al.*, 2016), furent des étapes clés dans l'obtention de nombreuses structures de grands complexes solubles. Toutefois, aux dires d'équipes utilisant ces systèmes, les clonages restent compliqués, prennent du temps et impliquent de savoir résister à la frustration : "when a MultiBac constructed over close to 6 months does not yield the desired complex, the PhD student who built it may retry once but will not retry twice...". Après examen de quelques systèmes d'expressions se prêtant à la co-expression de 6 ou 7 gènes (la co-transfection paraissant exclue dans une optique de production à l'échelle des 100 mg), mon choix s'est porté sur les vecteurs de transduction lentivirale développés par Jonathan Elegheert lors de son séjour au MRC (Elegheert *et al.*, 2018) et améliorés depuis.

Si ce système présente les avantages classiques des systèmes viraux, où l'on peut adapter les ratios entre gènes d'intérêt en adaptant les quantités relatives de virus lors de l'infection, il possède en plus deux caractéristiques ayant fait leur preuves pour nos projets. Tout d'abord l'intégration des gènes d'intérêt dans le génome cellulaire permet d'obtenir des lignées stables non-clonales rapidement, et mitige ainsi le problème récurrent de l'efficacité des transfections, très variable d'un lot à l'autre. Ensuite le kit de vecteurs, disponible sur Addgene, est compatible avec les cellules HEK-Trex et permet donc de disposer d'une expression inducible. Pour le récepteur 5-HT3, et quelques autres protéines vues au cours des années, l'expression inducible permettait un énorme gain de rendement. Depuis le début de l'année 2021, nous nous nous approprions graduellement la transduction de cellules HEK avec des lentivirus. Avant de s'attaquer aux récepteurs nicotiniques d'insectes, Uriel Lopez-Sanchez et Nancy Al-lahib ont ainsi mis au point l'expression du récepteur 5HT3AB qui a besoin de deux sous-unités. Cet exemple est détaillé ci-dessous au travers des figures 3 à 5.

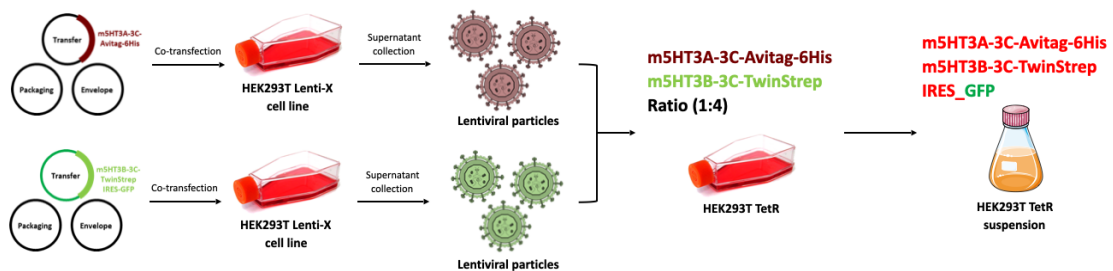


Figure 3. Schéma de principe de l'expression du récepteur 5-HT3AB avec des vecteurs lentiviraux

Après un sous-clonage dans des vecteurs pHR-CMV-TetO2, une co-transfection de cellules HEK293T LentiX avec les plasmides d'enveloppe et de packaging permet de générer des particules virales. Cette co-transfection est réalisée séparément pour chaque construction, typiquement dans une flasque T25. Les surnageants de culture contenant les particules virales sont mélangés dans un ratio défini (normalement il faudrait titrer les quantités de particules virales dans chaque surnageant, nous ne le faisons pas encore) pour infecter des cellules T-Rex possédant le répresseur TetO. Les cellules sont ensuite adaptées à la culture en suspension, cultivées à grande échelle et induites par ajout de tétracycline pour production des récepteurs hétéromériques.

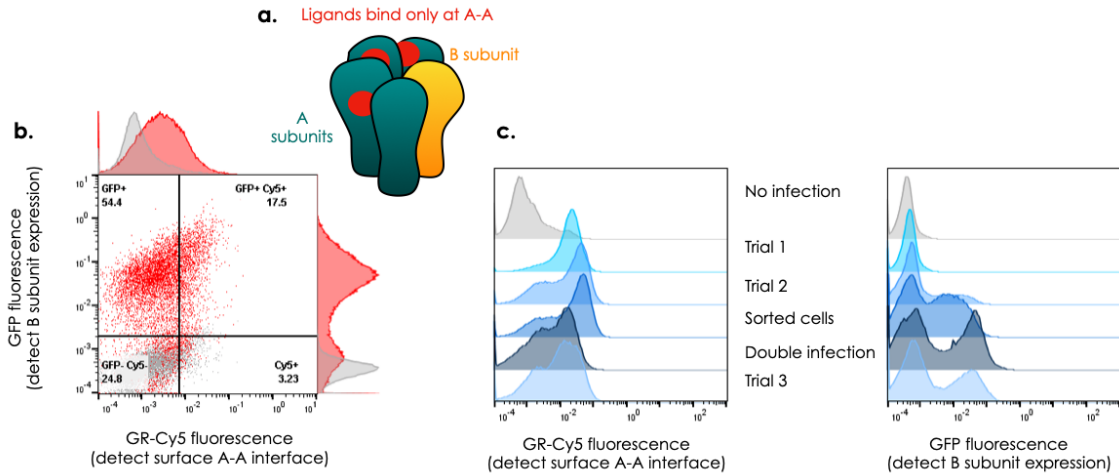


Figure 4. Analyse de l'expression du récepteur 5-HT3AB par cytométrie de flux

a. Schéma d'un possible récepteur 5-HT3AB. La littérature semble indiquer qu'une sous-unité B s'assemblerait avec 4 sous-unités A, tandis que les ligands orthostériques classiques ne se fixeraient que dans les sites formés à l'interface entre deux sous-unités A (Lochner and Lummis, 2010).

b et c. Suivi de l'expression d'un lot de cellules co-infectées par deux lentivirus, 48 heures après induction de l'expression. Deux marqueurs fluorescents, l'un intrinsèque et le second ajouté, sont utilisés sans perméabilisation des cellules. Il s'agit d'une part de la GFP placée après un site de ré-entrée du ribosome en 3' de la séquence codant pour la sous-unité B, et d'autre part d'un ligand spécifique du récepteur couplé à un fluorophore Cy5. La fluorescence est donc proportionnelle à l'expression de B d'une part, et au nombre de sites A-A formés à la surface d'autre part.

On voit que l'échantillon rouge présente une bonne expression de B mais peu d'expression de surface, tandis que l'échantillon bleu après tri cellulaire présente une bonne expression des deux sous-unités. Les autres échantillons bleus, issus d'autres essais d'infection, sont inclus pour donner une idée de la variabilité des résultats obtenus

A l'heure actuelle, nous vérifions la présence des deux sous-unités du récepteur 5-HT3AB, après purification, avant de mener une campagne d'imagerie par cryoEM pour valider définitivement l'usage des lentivirus.

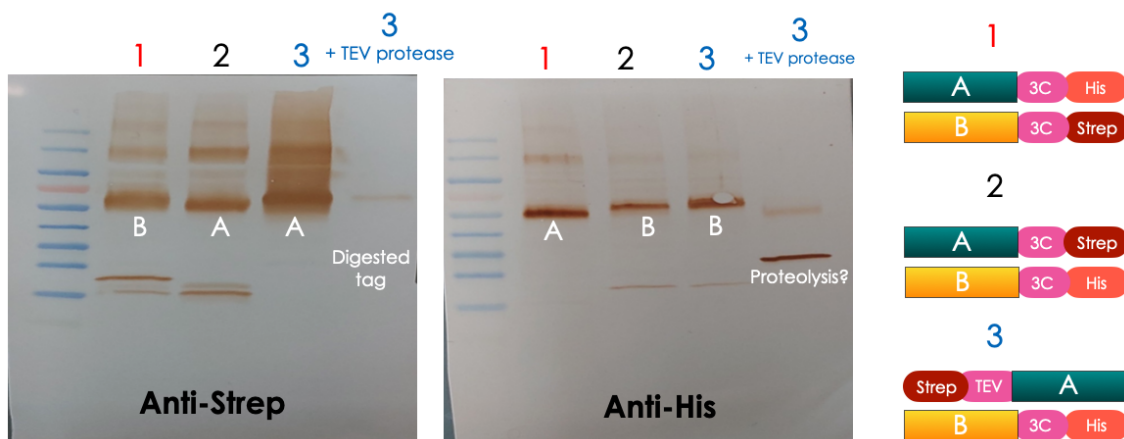


Figure 5. Les premières purifications du récepteur 5-HT3AB donnent une protéine possédant les 2 sous-unités

Après purification d'affinité, les protéines purifiées sont caractérisées par deux westerns blots, révélés avec des anticorps dirigés contre les étiquettes de purification de l'une ou l'autre sous-unité. 3 échantillons purifiés différents, correspondant à trois infections différentes de cellules, sont montrés. Le ratio des bandes donne une première idée de l'abondance comparative des sous-unités A et B. A ce stade je retiens surtout que les deux sont présentes dans une protéine pentamérique (profil SEC non montré).

A droite le schéma des constructions des 3 échantillons permet d'interpréter le western blot. Pour maximiser les chances de succès nous avons testé diverses combinaisons sous-unité - étiquette.

Microscopie électronique

Enregistrement des données

Depuis 2014, la cryomicroscopie électronique est graduellement devenue la principale approche structurale dans mes projets. Par chance, Grenoble dispose d'un des meilleurs plateaux de microscopie électronique en France (par ailleurs fort mal pourvue). Grâce à une collaboration avec Guy Schoehn et son groupe, nous avons cheminé petit à petit vers l'obtention régulière de reconstructions à résolution acceptable, au moins pour nos cibles de la famille pLGIC. Il y a seulement 4 ans, il nous fallait voyager jusqu'à Bâle et son Krios, puis passer plusieurs semaines à mouliner les données pour espérer obtenir une reconstruction à 4 Å. Aujourd'hui nous pouvons parfois enregistrer 3000 micrographies au cours d'un week-end de collecte au Glacios de l'IBS, en extraire 1 million de particules et observer les premières cartes de densité à 3 Å dès le mercredi.

Cette évolution est pour l'essentiel dûe aux améliorations graduelles de la plateforme: changement d'un microscope Polara pour un microscope Glacios (février 2019, essentiel pour la facilité d'utilisation par les utilisateurs moyens comme nous), installation d'une caméra à détection directe d'électron (été 2019, essentielle pour la qualité des données), installation de SerialEM (printemps 2020, essentielle pour la rapidité d'acquisition et la compression des données). Pour une part plus mineure, la capacité d'obtenir plus vite et des structures tient aussi au savoir-faire que notre équipe a petit à petit acquis sur le tas, via l'achat et le montage de stations GPUs (essentiels pour ne pas attendre des heures que le cluster se désengorge, et pour l'accès depuis la maison), via des essais et erreurs innombrables avec les programmes d'affinement Relion et Cryosparc.

Aujourd'hui je suis fier que les deux postdocs du laboratoire soient capables d'évaluer leurs grilles, de collecter et traiter leurs données de manière autonome. J'ai bien conscience aussi que cette autonomie est acquise au prix d'une approche "pousse-bouton", eux comme moi ne comprenant que de manière superficielle comment fonctionnent les lentilles du microscope ou les statistiques bayésiennes des programmes d'affinement. Nous avons bien entamé, au début du confinement de l'hiver 2020, la lecture commune du livre de Joachim Frank (Frank, 2006), (et une vieille version de ce texte contenait même des définitions, de la fonction de transfert de contraste, entre autres... $CTF = \sin\left(-\pi\lambda\delta f^2 + \frac{\pi}{2}C_s\lambda^3 f^4 - \alpha\right)e^{\frac{-Bf^2}{4}}$), mais nos résolutions ont fait long feu. Il reste difficile, au moins pour moi, d'aller du gène à la structure à une vitesse compétitive tout en saisissant pleinement les concepts de chaque méthode impliquée, de la biologie moléculaire, et de l'électrophysiologie, et de la microscopie électronique.

Orientations préférentielles

Une protéine solvatée isolée en solution ne montre aucune préférence d'orientation. Ce n'est qu'en rencontrant une surface, ou d'autres protéines voisines, qu'elle peut s'orienter de manière non aléatoire. Pendant le processus de congélation, les particules peuvent diffuser en contact avec la surface de 10 à 1000 fois (Glaeser and Han, 2017; Naydenova and Russo, 2017) (voir spécifiquement la note supplémentaire 1 de (Naydenova and Russo, 2017)). De même, comme l'épaisseur du film liquide et la distance interparticulaire dans un réseau dense sont du même ordre de grandeur, les particules se heurtent 10 à 1000 fois. Le temps entre le buvardage et la congélation varie de 30 ms à 1s sur un Vitrobot typique, et devrait donc être réduit ~1000 fois pour éliminer les interactions particules-surface. Par conséquent, les approches visant à éliminer les orientations préférentielles doivent plutôt viser à 1. modifier les propriétés de la surface ou à 2. modifier les propriétés de la particule. Dans le cas des protéines membranaires décrites ici, cela signifie respectivement 1. l'ajout d'une molécule tensio-active (éventuellement une deuxième, en

plus du détergent utilisé pour la purification) ou 2. l'ajout d'un partenaire protéique externe : nano/mega/macroboddy, Fab, toxine spécifique... Toutefois, l'apparition d'orientations préférentielles n'est pas systématique. Nous rencontrons ce problème pour les pLGICs dans les disques lipidiques (figure 7), mais pas en détergent (figure 6). Et il n'apparaît pas avec TREK (voir figure page 43).

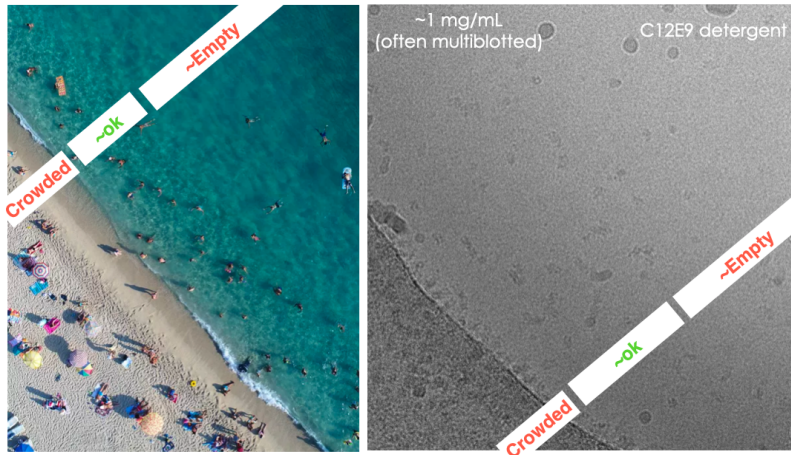


Figure 6. Une micrographie typique du récepteur 5-HT3 en détergent

Quel que soit le type de grille (du moins pour les grilles sans support de carbone ou de graphène), nous observons le phénotype suivant pour le récepteur 5-HT3 purifié en détergent C12E9 : une grande densité sur le carbone et tout au bord des trous, une petite zone intermédiaire exploitable bien que de densité limitée, et très peu de particules loin du bord. La figure propose une analogie avec une plage où les baigneurs/particules sont sur le sable ou au bord de l'eau.

Ces micrographies ne souffrent pas d'orientation préférentielle, et peuvent permettre d'acquérir de bons jeux de données, mais le nombre (et donc le temps) nécessaire est parfois un paramètre bloquant. Pour cette raison, et pour évaluer l'influence d'un environnement lipidique sur les conformations, nous avons testé plusieurs types de nanodisques, ainsi que les amphipols.

Tant en amphipols, qu'en nanodisques de saposin ou de MSP, le récepteur 5-HT3 s'oriente préférentiellement avec des vues de dessus (figure 7, panneaux du haut). L'ajout d'un détergent fluoré, dans l'idée de modifier la tension de surface tout en minimisant les interactions avec le domaine membranaire, résout le problème d'orientation, mais crée des problèmes secondaires. Par exemple, en amphipols pour retrouver une densité équivalente de particules, il faut multiplier par 15 la concentration de la solution de protéine (figure 7a bas) !

Une solution assez générale, car applicable dès que la protéine est insérée en disques MSP, consiste à ajouter à l'échantillon un assez gros partenaire de haute affinité (un mégaboddy) se fixant sur la protéine de pourtour du disque. Ces megabodies développés dans le laboratoire de Jan Steyaert, permettent de retrouver une homogénéité des vues pour le récepteur 5-HT3 (voir la figure de la publication, à laquelle nous avons été associés afin de fournir un des exemples d'application)

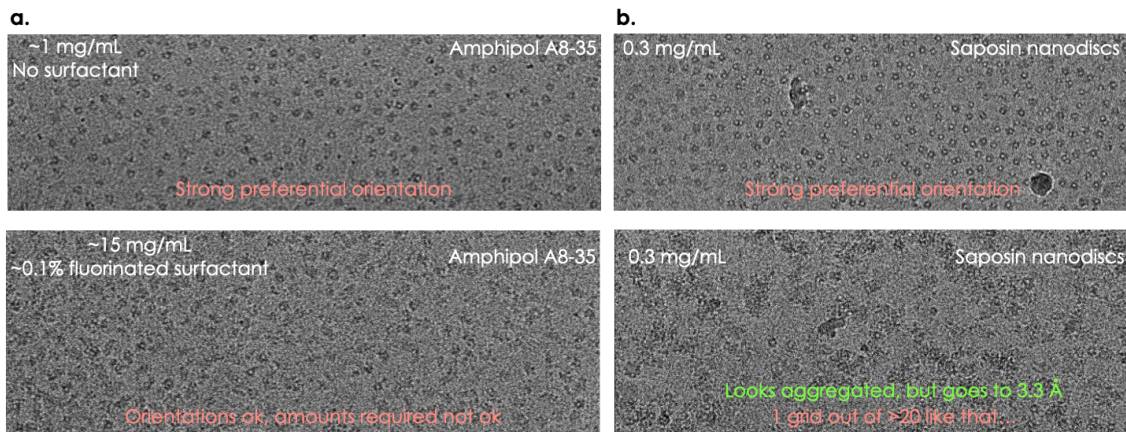


Figure 7. Orientations préférentielles en amphipols et en nanodisque de saposine

a. Récepteur 5-HT3 en amphipols, surtout vu de dessus en haut, et sous tous les angles en bas au prix de l'ajout de 0.1% d'un détergent fluoré... et d'une augmentation drastique de la concentration en protéine.

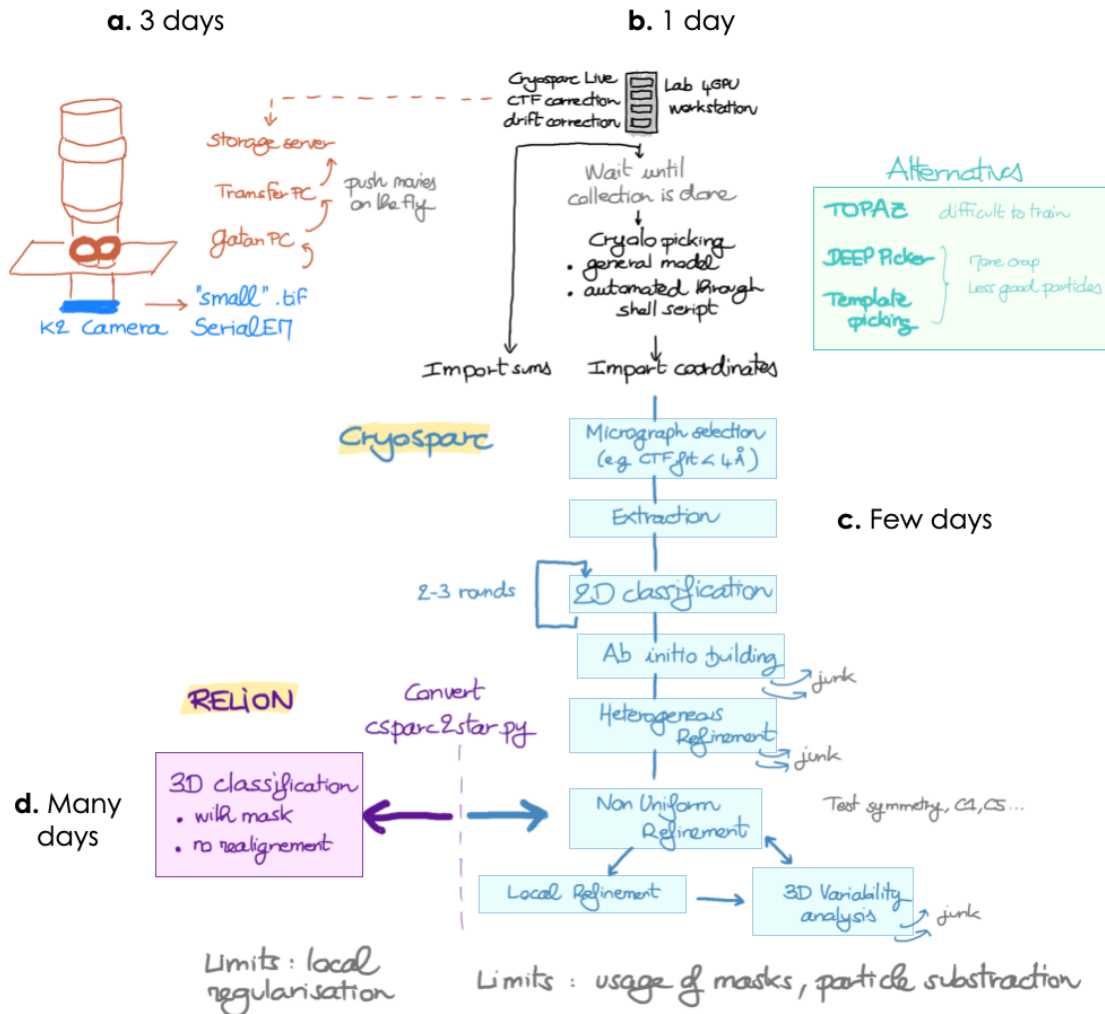
b. Récepteur 5-HT3 en nanodisques de saposine, surtout vu de dessus en haut, et sous tous les angles en bas... par hasard. Sur plus de 20 grilles testées avec ce type de disque, nous n'avons obtenu qu'une seule grille avec toutes les orientations.

Publication jointe

Uchański, T., Masiulis, S., Fischer, B., Kalichuk, V., López-Sánchez, U., Zarkadas, E., Weckener, M., Sente, A., Ward, P., Wohlkönig, A., Zögg, T., Remaut, H., Naismith, J. H., Nury, H., Vranken, W., Aricescu, A. R., Pardon, E., and Steyaert, J. (2021) Megabodies expand the nanobody toolkit for protein structure determination by single-particle cryo-EM. *Nat. Methods* **18**, 60–68

Seules les deux premières pages (pour avoir l'abstract et la figure de principe de construction du mégabody) et la figure supplémentaire spécifique à notre récepteur sont ici montrées.

Traitement des données



Chaque jeu de données est différent, et par conséquent chaque traitement suit un chemin particulier (des schémas spécifiques sont d'ailleurs fournis dans le matériel supplémentaire de chaque publication insérée dans ce manuscrit). J'inclus toutefois ci-dessus un schéma général pour illustrer les grandes étapes, et les limites, de la manière dont nous passons des micrographies aux reconstructions finales.

- Une collecte au Glacios prend souvent trois jours : le vendredi matin pour évaluer les grilles, l'après-midi pour mettre la collecte en place, et le weekend pour accumuler des films, à raison d'environ 50 par heure. SerialEM enregistre des "petits" fichiers au format tif compressés (~200 Mo pour un film de 40 images, bien mieux que les 2 Go du format dm4 de Digital Micrograph), ce qui autorise des transferts rapides. Ces fichiers sont poussés de l'ordinateur de la caméra vers un ordinateur de transfert puis le serveur de stockage de l'Institut. Ce serveur est accessible depuis nos machines GPUs, et nous utilisons Cryosparc Live pour importer, réaligner et corriger la CTF des micrographies, non tant pour gagner du temps que pour pouvoir surveiller le déroulement de la collecte. En effet les machines GPU sont accessibles depuis l'extérieur du campus, contrairement au microscope, et nous pouvons ainsi déceler un arrêt du microscope depuis la maison, sans venir au laboratoire, avantage important pendant les weekends.
- Nous attendons en général la fin de la collecte (mais cela pourrait se faire au fil de l'eau) pour identifier les particules, avec le logiciel d'apprentissage Cryolo (Wagner *et al.*,

2019), et en utilisant son modèle général qui reconnaît bien nos particules cylindriques. Cryolo fonctionne mieux pour nous que Topaz (Bepler *et al.*, 2018) ou le programme de Cryosparc (qu'il s'agisse de reconnaissance de moyennes, ou d'apprentissage). C'est notamment avec Cryolo que nous obtenons la meilleure exclusion des débris de glace, agrégats, du carbone.

- c. Les coordonnées des particules et les micrographies réalignées sont le point de départ du gros du traitement réalisé avec Cryosparc. Une première étape permet d'exclure les mauvaises micrographies, typiquement celles dont la correction de CTF, ou l'épaisseur de glace sont hors des clous. Le Glacios de l'IBS étant plutôt stable, nous jetons en général moins de 10% des micrographies. La suite est classique avec des étapes de tamisage des particules en 2D puis en 3D. Le gain de temps lors de ces étapes que permet Cryosparc par rapport à Relion, grâce à une meilleure gestion du cache et des classifications utilisant un sous-ensemble des particules, ce gain de temps est appréciable. Typiquement, avec nos jeux de ~300'000 particules au niveau des classes 2D, nous pouvons travailler directement avec des boîtes de 256 pixels et atteindre l'étape d'affinement 3D en 1 jour.

De plus l'affinement non-uniforme proposé par Cryosparc (Punjani, Zhang and Fleet, 2020) permet d'obtenir des cartes de densité de bonne qualité et bien interprétables, comparativement aux autres programmes d'affinement. Les évolutions en cours, qui devraient bientôt permettre l'affinement d'une hétérogénéité continue (Punjani and Fleet, 2021), semblent particulièrement excitants pour les protéines comme les pLIGCs dans lesquelles les transitions conformationnelles couplent des petites mouvements inter-domaines à des déformations tertiaires.

Cryosparc présente toutefois deux limites encore, à mon sens : une gestion imparfaite de l'asymétrie et des masques, et l'absence de classification sans réalignement. Pour des protéines pseudo symétriques comme les nôtres, il est parfois essentiel de pouvoir réaliser des classifications en se focalisant sur une seule sous-unité - et le plus souvent sans réaligner les particules car le signal de cette sous-unité par rapport à l'ensemble de la particule est trop faible. Nous n'avons pas encore trouvé le moyen de faire ces classifications avec Cryosparc

- d. En conséquence, nous utilisons les possibilités de conversion de format entre Cryosparc et Relion (Scheres, 2012; Zivanov *et al.*, 2018) pour effectuer les classifications avec ce dernier logiciel (typiquement sans réalignement et avec un paramètre $T > 20$).

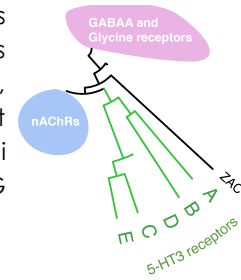
Il reste plusieurs angles morts dans nos traitements de données. Tout d'abord nous n'avons pas de méthode semi-automatique pour répartir les micrographies en groupes selon le *beam tilt* avec lequel elles ont été acquises, ce qui rend long et complexe les affinements des aberrations (mais la plupart du temps, les résolutions de nos reconstructions ne sont pas assez bonnes pour ce que soit un problème criant). Ensuite, nous n'avons jamais encore réussi à améliorer un jeu de données grâce à la soustraction de signal (ni avec Cryosparc ni avec Relion), alors même qu'une bonne partie des publications avec des petites protéines membranaires indiquent cette étape comme importante dans les phases tardives du traitement de données.

Après obtention d'une reconstruction, nous utilisons des méthodes de modifications de densités, basées soit sur l'optimisation de la courbure/continuité dans Phenix (Terwilliger *et al.*, 2020), soit sur l'apprentissage profond comme DeepEMhancer (spectaculaire, trop beau pour être honnête ?) (Sanchez-Garcia *et al.*, 2020), soit sur la régularisation locale comme LocalDeblur (Ramírez-Aportela *et al.*, 2020). La construction des modèles est effectuée surtout avec Coot (Emsley *et al.*, 2010), et un peu avec Isolde (Croll, 2018).

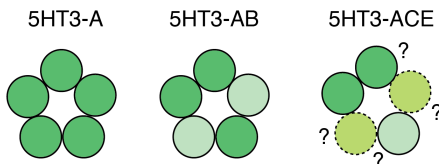
Les récepteurs 5-HT3 de la sérotonine

La famille des récepteurs-canaux pentamériques

Les récepteurs pLGICs des mammifères se répartissent en quatre sous-catégories en fonction du neurotransmetteur qu'ils reconnaissent. Les récepteurs de l'acide γ -aminobutyrique ($GABA_A$ R) et de la glycine (GlyR) présentent des canaux sélectifs des anions et participent à la transmission inhibitrice tandis que les récepteurs nicotiniques de l'acétylcholine (nAChR) et de la sérotonine 5-HT3 sont sélectifs des cations et propagent les signaux excitateurs (Thompson, Lester and Lummis, 2010; Wu *et al.*, 2015). Les récepteurs 5-HT3 sont structurellement et fonctionnellement distincts des six autres classes de récepteurs 5-HT, qui appartiennent tous à la famille des récepteurs activés par les protéines G (Barnes *et al.*, 2009; Koyama, Kondo and Shimada, 2017).



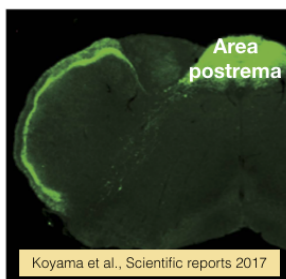
Sous-unités et assemblage des récepteurs 5-HT3



Dans la famille des pLGIC, seuls quelques récepteurs sont constitués de cinq sous-unités identiques et forment des homo-pentamères. La plupart des récepteurs sont constitués d'une combinaison spécifique de plusieurs sous-unités homologues et forment des hétéro-pentamères. Les récepteurs 5-HT3

humain peuvent être constitués de 5 sous-unités A identiques, ou d'un mélange de A et d'une des sous-unités B, C, D ou E (Davies *et al.*, 1999; Boyd *et al.*, 2003; Niesler *et al.*, 2007; Niesler, 2011). Les études structurales du récepteur 5-HT3 se sont limitées jusqu'à présent au sous-type homomérique, qui n'est sans doute pas le plus abondant *in vivo*, tandis que les études fonctionnelles concernent surtout les récepteurs comprenant des sous-unités A et B (Thompson, Price and Lummis, 2011; Thompson and Lummis, 2013). On sait très peu de choses sur la distribution, le rôle et la pharmacologie des sous-unités C, D et E, même si un polymorphisme de ces dernières a été associé à l'anxiété, à la dépression, au trouble bipolaire et aux troubles gastro-intestinaux (Krzywkowski *et al.*, 2008; Walstab, Rappold and Niesler, 2010). Les outils font cruellement défaut pour évaluer quels sous-types de récepteurs 5-HT3 sont présents à la membrane cellulaire dans un tissu donné, pour établir la stœchiométrie et la disposition des sous-unités dans ces sous-types, pour comprendre leur rôle physiologique.

Enfin il est intéressant de noter que les rongeurs, qui ne peuvent vomir et produisent des excréments sous forme de boulettes sèches, ne possèdent que les deux sous-unités A et B.



Distribution

Les récepteurs 5-HT3 sont situés dans de nombreuses zones du cerveau (Koyama, Kondo and Shimada, 2017) (par exemple l'hippocampe, l'amygdale, l'aire postrema) et dans les organes internes, par exemple le système nerveux entérique où ils régulent les vomissements, la motilité intestinale et le péristaltisme. On les a également trouvés dans les cellules β du pancréas, où ils régulent la sécrétion d'insuline pendant la grossesse (Ohara-Imaizumi *et al.*, 2013); dans la vessie et les voies urinaires (Bhattacharya *et al.*, 2004), où des récepteurs hyperactifs entraînent des uropathies obstructives mortelles, tandis que les souris mâles $Htr3A^{-/-}$ présentent une fréquence accrue des mictions (Ritter *et al.*, 2017); dans la glande lacrymale, où ils jouent un rôle dans le syndrome de l'œil sec (Imada *et al.*, 2017), dans la graisse brune (Oh *et al.*, 2015)... un peu partout donc.

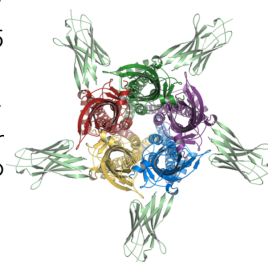
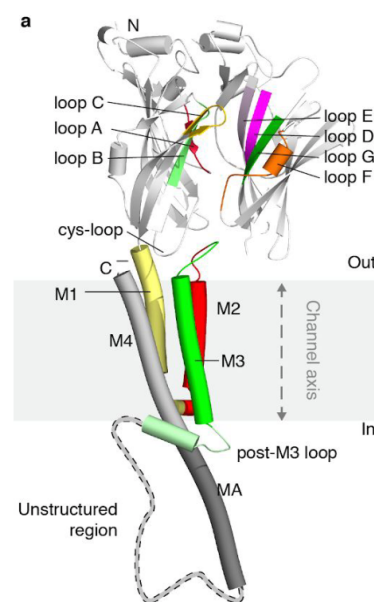
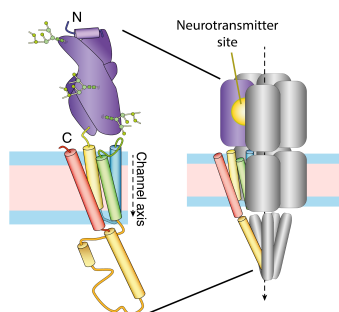
Architecture¹

Chaque sous-unité du récepteur 5-HT₃ possède un grand domaine extracellulaire (ECD, environ 220 résidus), quatre domaines transmembranaires (M1 à M4), et un domaine intracellulaire (ICD environ 100 résidus) entre M3 et M4. L'ECD contient le site de liaison de l'agoniste, qui est situé à l'interface de deux sous-unités adjacentes et est formé par trois boucles (A-C) d'une sous-unité (la principale) et trois brins (appelés boucles D-F) de la sous-unité adjacente ou complémentaire. Les résidus clés qui contribuent à la poche de liaison dans ces boucles ont été identifiés à partir de données structurales (Hassaïne *et al.*, 2014), et par une série d'études fonctionnelles [pour des analyses, voir (Barnes *et al.*, 2009; Thompson, Lester and Lummis, 2010)]. Le site de liaison contient la boîte aromatique, que l'on retrouve dans tous les récepteurs pLGICs, et dans le récepteur homomérique 5-HT_{3A},

elle est constituée de W183 (boucle B), W90 (boucle D), Y153 (boucle E), F226 (boucle C), et Y234 (boucle C). Le domaine transmembranaire de chaque sous-unité des récepteurs 5-HT₃ est composé de quatre hélices transmembranaires, avec de courtes boucles entre M1 et M2 (intracellulaire) et M2 et M3 (extracellulaire). Les hélices M2 bordent le pore ionique, et les résidus qui font face au pore contribuent au contrôle du flux et à la sélectivité des ions. M1, M3 et M4 protègent tous M2 des lipides membranaires environnants et jouent un rôle dans la fonction du récepteur. La proline conservée dans M1, par exemple, est essentielle pour l'activation, et le récepteur est exprimé mais ne peut pas fonctionner lorsque cette proline est remplacée par une alanine, une glycine ou une leucine (Dang *et al.*, 2000). L'ICD est formée principalement par la grande boucle intracellulaire M3-M4 ; cette région est responsable de la modulation du récepteur et joue également un rôle dans le trafic. Des études de délétion révèlent que ce domaine n'est pas essentiel, car chez le récepteur 5-HT_{3A} de la souris il peut être remplacé par un hexapeptide sans perte de fonction (Jansen, Bali and Akabas, 2008). Les détails structuraux sur l'ICD sont rares, mais chaque sous-unité est connue pour posséder une hélice, qui contribue à des ouvertures, connues sous le nom de portails, juste au-dessous du niveau de la membrane. Les résidus qui bordent ces portails sont importants pour la conductance ionique ; lorsque les résidus de la sous-unité 5-HT_{3A} sont remplacés par ceux de la sous-unité 5-HT_{3B}, la conductance du canal unique, qui est très faible dans le récepteur homomérique 5-HT_{3A}, est augmentée pour atteindre celle du récepteur hétéromérique 5-HT_{3AB} (Kelley *et al.*, 2003).

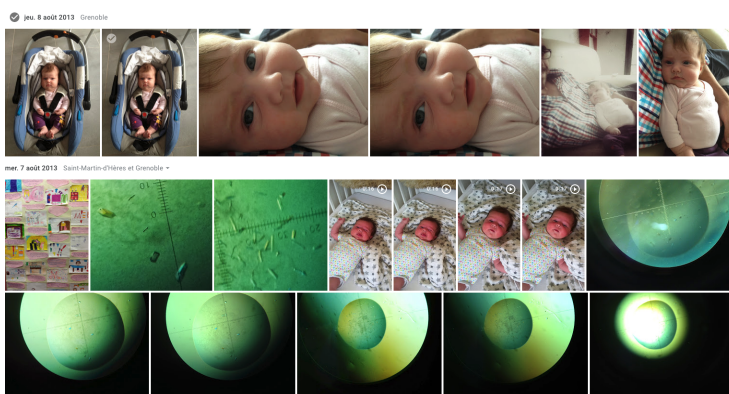
Ce sont les détails de cette architecture que la structure cristallographique du récepteur 5-HT₃ permet d'observer. La publication décrivant cette structure, obtenue à l'issue d'un périple de presque 4 ans, fut acceptée par Nature. Je ne détaille pas ici nos efforts et tentatives pour caractériser les nanobodies se liant au récepteur 5-HT₃, avant d'avoir la chance d'en trouver un, le VHH15, qui fit passer la diffraction des cristaux de 7 à 3.5 Å. Les mois précédents, j'étais sur le point d'arrêter et de commencer autre chose, et l'emploi du mot "chance" est approprié. C'est en mai 2013 que l'action fortement inhibitrice du VHH15

¹ Le texte de ce paragraphe est traduit, et seulement légèrement l'impressionnante (211 pages...) revue à propos des récepteurs de la sérotonine Nick Barnes et Daniel Hoyer, parue cette année et à laquelle j'ai participé des structures (Barnes *et al.*, 2021).



sur les courants portés par le récepteur 5-HT3 a été mise en évidence par Christophe Moreau. Ce même mois, j'arrêtais les aller-retour entre Grenoble (où j'étais employé) et Lausanne (ou je faisais encore les purifications - et surtout où se trouvait ma femme très enceinte). Après une naissance, un déménagement, et des plaques de cristallisation réalisés les yeux pas très en face des trous, j'ai envoyé un dewar à Takashi Tomizaki au PSI, pendant la fermeture estivale de l'ESRF. Voici l'intégralité de son mail un dimanche soir d'août:

i'm doing experiments. best one diffracted to 3.7 Å or so. will continue.



Capture d'écran de ma galerie de photos d'août 2013. On devine les cristaux qui seront les premiers à diffracter, perdus au milieu des 1000 photos de ma fille Constance née deux mois auparavant.

La publication :

Hassaine G, Deluz C, Grasso L, Wyss R, Tol MB, Hovius R, Graff A, Stalhberg H, Tomizaki T, Desmyter A, Moreau C, Li XD, Poitevin F, Vogel H, Nury H
X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT3 receptor
Nature 2014 512:276-281

est entièrement reproduite en fin de section

Mécanisme moléculaire du gating et du transport ionique

Isacoff, Jan et Minor résumant en une phrase lapidaire : *the basic function of an ion channel can be distilled into, "The hole opens. Ions go through. The hole closes."* (Isacoff et al., 2013). Dans le cas des pLGICs, cette ouverture, transitoire, a lieu le plus souvent à la suite de la liaison de neurotransmetteurs. Ces récepteurs-canaux fonctionnent donc comme des transducteurs de signaux allostériques à travers la membrane plasmique (Changeux, 2013) : lors de la liaison d'une ou plusieurs molécules de neurotransmetteur dans un site extracellulaire situé à ~50 Å du pore, les récepteurs subissent des transitions conformationnelles complexes qui entraînent l'ouverture transitoire d'un canal transmembranaire intrinsèque (daCosta and Baenziger, 2013; Nemezc et al., 2016). Des flux d'ions traversent la membrane, en descendant le gradient électrochimique à des taux de ~10⁶ ions par seconde. Ce transport est sélectif pour la charge mais généralement pas pour le type atomique. Par exemple, le récepteur 5-HT₃ est perméable ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ en conditions physiologiques. Lors d'une exposition prolongée à un neurotransmetteur, les pLGICs se désensibilisent et les canaux ioniques se ferment (Gielen and Corringer, 2018).

Les questions relatives au mécanisme moléculaire de transitions et de transport sont centrales dans nos études du récepteur 5-HT₃, elles peuvent se décliner en mille formulations à l'échelle de la protéine ou d'une de ses régions. Par exemple deux questions ciblées, auxquelles nous avons répondu seulement partiellement :

- Y a-t-il une seule porte dans le canal, ou bien deux, l'une pour l'activation et la seconde pour la désensibilisation ?
- Quelles sont les conséquences de la liaison d'un agoniste sur l'interface entre le domaine extracellulaire et le domaine membranaire, région clé du couplage allostérique entre le site et la(les) porte(s) ?

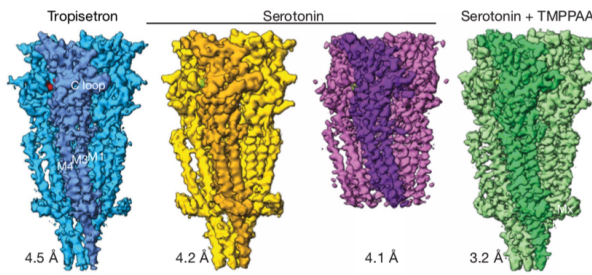
Par exemple aussi une interrogation plus large, pour laquelle nos expériences ne font qu'ajouter quelques touches à une esquisse de réponse dessinée par des décennies d'électrophysiologie :

- Les pLGICs fonctionnent tous en première instance selon un modèle à trois états fermé-ouvert-désensibilisé. Quel est le pendant structural de ces états définis sur la base d'un phénotype électrophysiologique ? Existe-t-il une, plusieurs, un continuum de structures fermées (ou ouvertes, ou désensibilisées) ? Quels sont les points communs entre ces structures d'un récepteur à l'autre ?

Si les travaux d'électrophysiologie s'étalent sur des décennies pour apporter des éléments de réponse à ces questions, l'explosion des études structurales qui aimeraient également y répondre est plus récente. Ainsi les multiples conformations des récepteurs nAChR $\alpha 7$ (Noviello et al., 2021), GABA_A $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ (Masiulis et al., 2019) ou GlyR (Kumar et al., 2020; Yu et al., 2021) ont toutes été obtenues ces deux dernières années. Je ne souhaite pas me lancer ici dans une revue comparative des mécanismes inférés à partir de ces structures homologues du récepteur 5-HT₃, ni même d'ailleurs dans une comparaison de toutes les structures du récepteur 5-HT₃ (Basak, Gicheru, Rao, et al., 2018; Basak, Gicheru, Samanta, et al., 2018; Basak et al., 2019, 2020; Zhang et al., 2021) (deux équipes concurrentes à la nôtre en ont jusqu'à aujourd'hui obtenues). Par contre j'aimerais qualifier l'état de ce champ de recherche : dynamique, foisonnant, mais souffrant d'un discours trop catégorique. Ainsi, pour faire accepter un manuscrit dans un journal prestigieux, on "révèle" l'état ouvert (ou fermé, ou désensibilisé) en glissant brièvement sur, voire en cachant sous le tapis, pourquoi on est pas sûr vraiment que la structure soit ouverte, et comment il a fallu sélectionner 10'000 particules sur 1 million pour y parvenir .

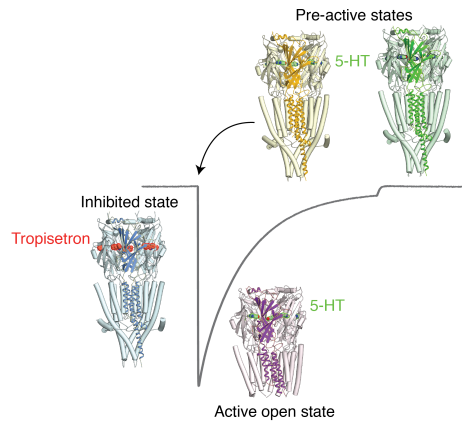
Cette tension entre la difficulté intrinsèque de faire correspondre une structure à un état physiologique, et le besoin de raconter une histoire dans les publications, cette tension existe dans mes travaux sur le récepteur 5-HT₃ comme dans ceux des collègues et compétiteurs s'intéressant aux pLGICs. Dans la publication que ce paragraphe introduit, qui décrit trois conformations récepteur 5-HT₃, la phrase que je préfère est d'ailleurs : "the challenge of

matching structures to states without ambiguity transcends the present study and pertains to the whole field of pLGIC structures".



Cette publication décrit 4 structures cryoEM du récepteur 5-HT₃, en présence soit d'un antagoniste (structure bleue, et les choses sont faciles : c'est un état inhibé), soit en présence d'un agoniste (jaune et violette, on attendrait un état désensibilisé et on observe un mélange de structures ouvertes et de structures avec un pore fermé en haut), soit en présence d'un modulateur allostérique

positif en sus d'un agoniste (verte, on attendrait un état ouvert et on observe surtout une structure ressemblante à la jaune). Le type de mouvements tertiaire et quaternaire permettant le passage d'une structure à l'autre est décrit. Le mécanisme de wetting/dewetting par lequel la porte d'activation s'ouvre ou se ferme est bien décrit, dans une approche de simulation qui va bien au-delà des arguments simplistes sur la taille des ions et du pore, qu'on trouve encore dans des publications en 2018 comme maintenant. Enfin, des expériences fonctionnelles de Voltage-Clamp Fluorometry (VCF) et de substituted cysteine accessibility mutagenesis (SCAM) laissent à penser que les structures jaune et verte sont plutôt des états intermédiaires d'activation que des états désensibilisés (le message de la publication étant donc résumé par le schéma ci-contre).



J'ai enregistré au microscope Krios de Bâle le jeu de données pour l'une des structures du 28 au 30 mars 2017. Il y a 5 heures de route de Grenoble à Bâle, et j'étais tendu à l'idée que ma seconde fille ne se décide à naître sans attendre mon retour. Mais elle patienta une semaine de plus pour naître le 6 avril. Le selfie ci-contre, pris plus d'un an plus tard en juillet 2018, nous montre Jacques Neyton et moi, coincés au laboratoire un weekend mais heureux de finir enfin les révisions du manuscrit et mugs emplis de rhum pour l'occasion. J'ai vraiment aimé le travail commun que nous avons mené au moment de ce papier, et notre compagnonnage scientifique de ces quelques années, marqué par notre complémentarité scientifique structure-fonction, mais aussi d'avancement dans la carrière et de caractère.

La publication :

Polovinkin, L., Hassaine, G., Perot, J., Neumann, E., Jensen, A. A., Lefebvre, S. N., Corringer, P.-J., Neyton, J., Chipot, C., Dehez, F., Schoehn, G., and Nury, H. (2018) Conformational transitions of the serotonin 5-HT₃ receptor. *Nature* **563**, 275–279

est entièrement reproduite en fin de section.

Pharmacologie structurale : les antiémétiques

Les récepteurs 5-HT₃ sont la cible de médicaments pour une indication clinique principale, ce qu'on pourrait trouver surprenant au vu de la diversité de leurs localisations et sans doute de leurs rôles. Le granisétron, le tropisétron et toute la famille des médicaments de la famille des -étrons sont des antagonistes spécifiques des récepteurs 5-HT₃ (Thompson, 2013). Ils sont largement utilisés comme médicaments antiémétiques pendant une chimiothérapie ou pour la prévention des nausées et des vomissements postopératoires. Ces composés ont révolutionné les chimiothérapies lors de leur introduction dans les années 1980 (Sanger and Andrews, 2018) (avant, les nausées et vomissements obligeaient les patients à rester à l'hôpital, et causaient des arrêts de traitement), ils ont rapporté beaucoup d'argent aux entreprises qui les ont développés ou acquis. Par exemple, lors de sa dernière année sous brevet, en 2006, les ventes d'ondansétron se sont élevées à 1.5 milliard de dollars. Pour autant, le récepteur 5-HT₃ n'est plus du tout une cible à la mode chez les "Big Pharma", l'idée prévalant que le travail a été fait et qu'il n'y a pas d'autres applications cliniques pour cette cible. Cette même idée est mise en avant de manière plus large pour tous les récepteurs de la sérotonine par Barnes et Hoyer (Barnes *et al.*, 2021) : "In 1994, there were six out of the eight authors [of the review] who worked in "Big Pharma" whereas there are none for the present 5-HT Receptor review. This is explained by the lesser interest for exploratory 5-HT research in the industry [...], with less emphasis on 5-HT translational research". Toutefois, cette généralisation me paraît fautive au vu de l'incroyable dynamique de la recherche sur le récepteur 5-HT_{2A}, liée au développement de composés hallucinogènes (ou non) dans une optique médicale (Cameron *et al.*, 2020; K. Kim *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2021).

Pour revenir aux antiémétiques de la famille des -étrons, nous avons obtenu la structure du récepteur 5-HT₃ en complexe avec le tropisétron (Polovinkin *et al.*, 2018) puis le palonosétron (Zarkadas *et al.*, 2020).

La publication :

Zarkadas, E., Zhang, H., Cai, W., Effantin, G., Perot, J., Neyton, J., Chipot, C., Schoehn, G., Dehez, F., and Nury, H. (2020) The Binding of Palonosetron and Other Antiemetic Drugs to the Serotonin 5-HT₃ Receptor. *Structure* **28**, 1131–1140.e4

est entièrement reproduite en fin de section.

Pharmacologie structurale : l'antidépresseur vortioxétine

Cette section correspond à un travail en cours mené par Uriel Lopez-Sanchez.

Un petit nombre de composés ciblant les récepteurs 5-HT3 sont testés, ou prescrits, pour d'autres indications thérapeutiques. C'est le cas de la vortioxétine, un antidépresseur introduit en 2014 en Europe (et qui représente aujourd'hui ~15% du marché français des antidépresseurs). La vortioxétine antagonise puissamment le récepteur 5-HT3 en provoquant semble-t-il une désensibilisation prolongée (Ladefoged *et al.*, 2018). Mais la vortioxétine est également un antagoniste des récepteurs 5-HT7 et 5-HT1D, un agoniste partiel des récepteurs 5-HT1B, un agoniste des récepteurs 5-HT1A et un inhibiteur des transporteurs 5-HT (qui est la cible moléculaire classique des antidépresseurs dits inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine, ou SSRI). La vortioxétine a une activité antidépressive et procognitive significative dans les modèles de rongeurs et les essais cliniques (Mørk *et al.*, 2012; Sanchez, Asin and Artigas, 2015) et est actuellement commercialisée comme un antidépresseur ayant, peut-être, des propriétés d'amélioration de la cognition. Malgré la polyspécificité de la vortioxétine (on trouve également le terme de "composé multimodal" mais bizarrement pas celui de "composé non spécifique"), certains auteurs pensent que l'inhibition des récepteurs 5-HT3 en particulier joue un rôle important dans son mécanisme d'action. Ainsi, chez les rongeurs, la vortioxétine occupe préférentiellement les récepteurs 5HT3 et le transporteur 5-HT à faibles doses, et les effets de la vortioxétine peuvent être reproduits par l'administration conjointe d'un SSRI et d'un antagoniste des récepteurs 5-HT3 (Mørk *et al.*, 2012; Sanchez, Asin and Artigas, 2015). L'effet procognitif de la molécule — et le bien fondé même de son autorisation — a cependant été mis en doute (Cosgrove *et al.*, 2016), bien qu'une explication mécanistique en ait été proposée, via le blocage des récepteurs 5-HT3 sur des populations spécifiques d'interneurones GABA dans le cortex cérébral (Riga *et al.*, 2016). Quoiqu'il en soit, la vortioxétine est un composé fascinant du point de vue de la pharmacologie structurale pour deux raisons.

- Puisque la vortioxétine promet de stabiliser l'état désensibilisé du récepteur humain, elle pourrait permettre d'en obtenir la structure qui reste encore inconnue - ou incertaine.
- Le composé est un agoniste partiel entraînant une désensibilisation prolongée du récepteur humain, mais un pur antagoniste du récepteur murin. Quelle peut-être la base de cette différence d'effet ?

Nous avons, sous l'impulsion de l'équipe danoise de Anders Kristensen, obtenu les structures des récepteurs 5-HT3 murins et humain en complexe avec la vortioxétine. Ce travail, en cours de rédaction, montre via une série d'approches complémentaires (TEVC, VCF, cryoEM) que le composé stabilise bien l'état désensibilisé du récepteur humain, mais que malheureusement dans les conditions expérimentales de la cryoEM, le domaine membranaire est déformé. Le brouillon de ce manuscrit n'étant pas encore montrable, je me contente de copier à la page suivante les deux figures introduisant les structures des complexes - et j'espère pouvoir en dire plus lors de la soutenance !

Enfin je veux citer deux autres composés qui peut-être soulignent le potentiel clinique non encore réalisé du récepteur 5-HT3. La litoxétine (IC50 ~85 nM), développée comme antidépresseur (Angel *et al.*, 1993) mais jamais commercialisée, a été reconvertie comme un remède potentiel pour l'incontinence urinaire avec des essais de [phase II](#) initiés en 2017. L'azasetron est un antiémétique autorisé seulement au Japon, que l'entreprise française Sensorion a reconverti pour le traitement des pertes auditives neurosensorielles soudaines, avec un [essai de phase II en cours](#)

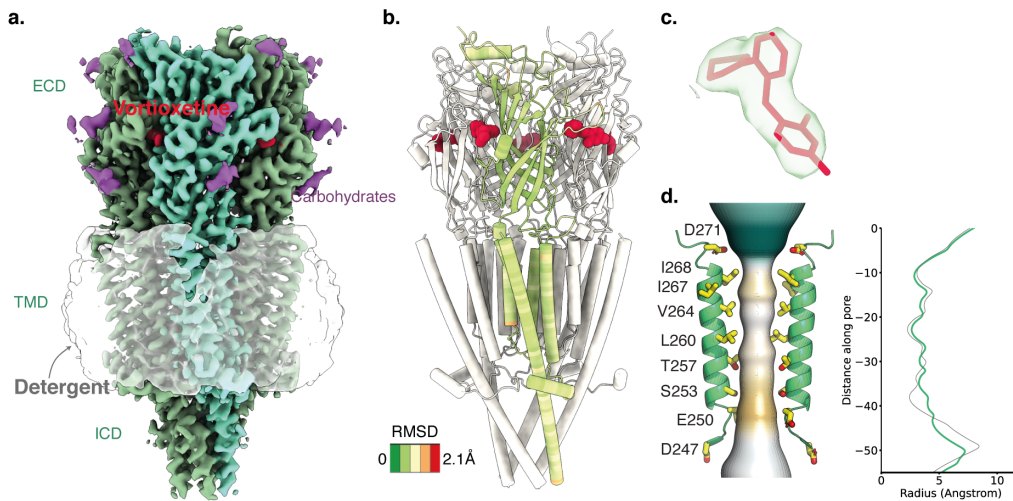


Figure 8, Structure and conformation of the mouse 5-HT3A receptor in complex with vortioxetine.

a. CryoEM and **b.** Cartoon representation of the overall structure of the receptor from the perspective of the membrane. In panel **b.** One subunit is colored according to its RMSD with the inhibited palonosetron-bound conformation (after superimposition of the whole pentamers), while the four others are in white. Vortioxetine is colored in red. **c.** Quality of the Coulombic potential map around vortioxetine. **d.** Close-up view of two opposing pore helices with lining residues depicted as sticks; the surface represents the ion pore and is colored by hydrophobicity. Pore radii are graphed next to the structure (green line, vortioxetine-bound, grey line, palonosetron-bound).

In conclusion, the mouse 5-HT3A receptor in complex with vortioxetine adopts a classical inhibited state.

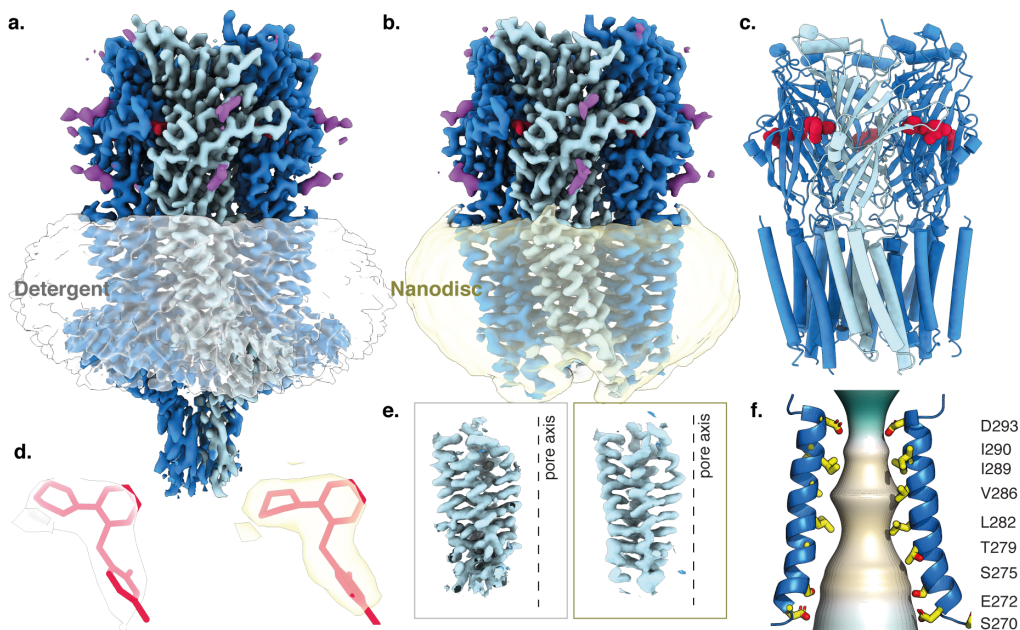


Figure 9. Structure and conformation of the mouse 5-HT3A receptor in complex with vortioxetine.

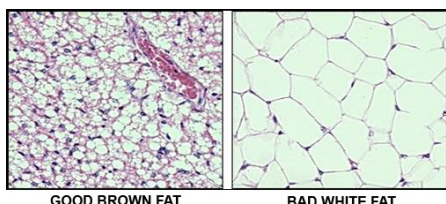
CryoEM representations of the overall human receptor obtained in **a.** detergent and **b.** nanodiscs from the perspective of the membrane. **c.** Cartoon representation. **d.** Quality of the Coulombic potential map around vortioxetine (good) and **e.** in the transmembrane domain (poor, especially for M2s). **f.** Close-up view of two opposing pore helices with lining residues depicted as sticks; the surface represents the ion pore and is colored by hydrophobicity.

In conclusion, the human 5-HT3A receptor in complex with vortioxetine adopts a distorted state at the TMD level, both in detergent and in nanodiscs.

Le récepteur 5-HT3, rôles exotiques

Je termine ce chapitre en évoquant deux rôles incertains du récepteur 5-HT3 décrits dans la littérature. Le premier impliquerait ces récepteurs dans la production de chaleur par le tissu adipeux brun, tandis que le second lui donnerait une place dans la communication entre le microbiome et l'hôte, via la production de granisetron par certaines bactéries intestinales.

Ces paragraphes ne correspondent ni à des recherches en cours dans mon équipe, ni à des projets futurs (mais j'ai été tenté !).



Rôle dans la graisse brune

La graisse brune est un type de tissu adipeux ; sa couleur provient de l'abondance de mitochondries chargées de fer, où la consommation du gradient de protons résultant de la respiration par la protéine membranaire UCP1 provoque la thermogénèse. La graisse brune brûle les lipides et produit de la chaleur, c'est pourquoi elle est

parfois appelée "bonne" graisse par opposition à la "mauvaise" graisse blanche. La découverte que la graisse brune n'est pas présente seulement chez les humains nouveau-nés et chez les mammifères adaptés au froid, mais qu'elle existe aussi chez les adultes humains, et la possibilité de transformer la graisse blanche des souris en tissu intermédiaire "beige", ont donné lieu à une

vague de recherches visant à comprendre le fonctionnement de la graisse brune et à déterminer si elle peut être induite à des fins de perte de poids (Carobbio *et al.*, 2019).

Un article examinant l'influence de la sérotonine périphérique sur l'homéostasie énergétique (Oh *et al.*, 2015) a démontré que les récepteurs 5-HT3 sont exprimés dans la cellule adipeuse brune. Leur absence ou leur inhibition déclenche une augmentation de l'activité de la graisse brune et une surexpression d'UCP1. Les données les plus frappantes indiquent que les souris *Htr3a* KO sont résistantes à l'obésité induite par le régime alimentaire (comparer les carrés rouges aux carrés noirs ouverts, SCD signifie *standard chow diet*, HFD signifie *high fat diet*). Une telle résistance à l'obésité avait été observée indépendamment lors d'un traitement avec un inhibiteur

(Weber *et al.*, 2009). Deux questions générales et naïves se posent à la lecture de cette étude. Premièrement, quel est le mécanisme de signalisation ? Les récepteurs 5-HT3, dans le contexte synaptique classique, signalent via un flux ionique lorsque la concentration locale de sérotonine passe rapidement de zéro à une concentration très élevée, puis revient à zéro. Fonctionnent-ils de la même manière dans la graisse brune où la concentration de sérotonine est moins susceptible de varier brutalement — ou se pourrait-il qu'ils possèdent une activité métabotrope, qui a été identifiée pour certains homologues de la famille (Kabbani and Nichols, 2018) ? Deuxièmement, l'antagoniste des récepteurs 5-HT3 pourrait-il être reorienté pour traiter l'obésité ? On peut toujours rêver d'un patch diffusant localement un cocktail de médicaments activant les tissus bruns/beiges et permettant de se gaver de burgers.

Lien avec les bactéries commensales

Écrire "microbiota" dans un moteur de recherche généraliste, ou de publications, permet de se rendre compte immédiatement de la vigueur du champ de recherche qui étudie les liens entre les bactéries commensales de l'intestin et la santé et le comportement. La sérotonine y joue d'ailleurs un rôle : certains métabolites bactériens modulent le nombre et le fonctionnement des cellules entérochromaffines (Yano *et al.*, 2015), qui sécrètent le gros de la sérotonine périphérique. Cette sérotonine, à l'intérieur du corps, peut entraîner une variété de réponses, et dans certains cas le récepteur 5-HT3 y joue un rôle (Bellono *et al.*, 2017). Cette sérotonine semble aussi jouer un rôle à l'extérieur du corps, dans l'intestin, et on trouve des bactéries commensales comme *Turicibacter sanguinis* capable d'importer ce neurotransmetteur via un transporteur

spécifique (Fung *et al.*, 2019) ! Plus troublante encore est l'idée que certaines bactéries puissent naturellement produire un inhibiteur spécifique du récepteur 5-HT₃, le granisetron, afin de moduler la réponse immunitaire de l'hôte (Gong *et al.*, 2019). Cette découverte hétérodoxe, et qui mériterait d'être reproduite, impliquerait que cette molécule, qu'on croyait pur produit de la chimie médicinale dans les années 1980 (Sanger and Andrews, 2018), soit en fait entièrement similaire à une molécule naturelle produite dans nos intestins, y compris par une bactérie aussi commune que *E. coli*! Et comme la nature fait rarement les choses en un seul exemplaire, je ne peux m'empêcher d'imaginer qu'alors il existerait tout un bestiaire de métabolites bactériens encore inconnus qui seraient des modulateurs de mon récepteur favori. Quelle perspective ! Si nous avons pu le faire facilement, j'aurais aimé chercher des inhibiteurs des courants portés par le récepteur 5-HT₃ dans des surnageants de culture de bactéries commensales cultivées en anaérobie.

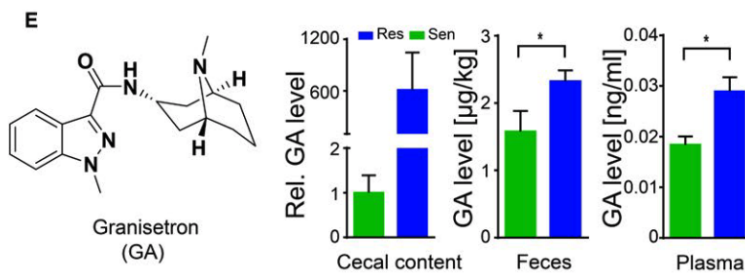


Figure 10. Structure du granisetron et niveau retrouvés chez des souris sensibles (vert) ou résistantes (bleu) à un choc septique. On retrouve le granisetron, apparemment produit par des bactéries commensales, dans les intestins et les excréments mais aussi dans le système circulatoire des animaux ayant survécu à un

choc septique ! L'hypothèse de la publication est un effet de modulation de l'inflammation par ce granisetron, via les récepteurs 5HT₃ des macrophages. Extrait de (Gong *et al.*, 2019)

Autres récepteurs-canaux pentamériques

GLIC

Cette section correspond à des travaux passés.

J'ai rejoint les groupes de Pierre-Jean Corringer et Marc Delarue à l'Institut Pasteur en janvier 2008. Le premier a une connaissance approfondie des pLGICs, tandis que le second dirige un laboratoire centré sur la cristallographie et l'analyse de structure. A cette époque ils collaboraient étroitement pour comprendre les transitions conformationnelles des récepteurs-canaux pentamériques, en se servant d'une protéine modèle bactérienne nommée GLIC. Aucune structure à haute résolution n'était encore connue. Une structure à moyenne résolution, obtenue par microscopie électronique, du récepteur nicotinique musculaire de l'acétylcholine, provenant du poisson torpille, était disponible (Miyazawa, Fujiyoshi and Unwin, 2003; Unwin, 2005), ainsi que de nombreuses structures cristallines de protéines solubles homologues du domaine extracellulaire (ECD), avec et sans ligands (Brejc *et al.*, 2001; Celie *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2005). Toutefois le manque de détail dans les structures d'Unwin, et l'absence de pore dans les AChBPs, ne permettaient pas une compréhension moléculaire des transitions allostériques. En se lançant sur la base d'une analyse bioinformatique identifiant de premiers homologues bactériens de la famille (Tasneem *et al.*, 2005), Pierre-Jean et son équipe venaient de caractériser fonctionnellement l'un d'entre eux, GLIC (pour *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel) comme un canal cationique activé par les protons (Bocquet *et al.*, 2006). A mon arrivée, le protocole de purification de GLIC venait d'être mis en place. J'ai eu la chance de résoudre la structure de GLIC dans une conformation apparemment ouverte au cours de la première année dans un contexte de forte compétition (Bocquet *et al.*, 2009). Nous avons également résolu la structure du domaine extracellulaire isolé de GLIC (Nury, Bocquet, *et al.*, 2010) qui s'exprimait bien en bactérie, existait sous forme monomérique en solution mais cristallisait sous forme hexamérique. J'ai passé six mois à analyser les étapes initiales de la fermeture du canal par dynamique moléculaire (Nury, Poitevin, *et al.*, 2010). Nous avons également établi les principes de la modulation allostérique de GLIC par les anesthésiques généraux (Nury *et al.*, 2011), des médicaments largement utilisés en clinique et qui ciblent les récepteurs GABA_A de cette famille. Durant la dernière année de mon séjour à Paris, j'ai commencé à affiner des structures de mutants permettant d'éclairer la transition au niveau de la porte. Ce travail mené par Marie Prevost a été terminé après mon départ (Prevost *et al.*, 2012).

Ni avant ni depuis mon séjour pasteurien je n'ai connu de période aussi faste quant au rythme de publication, conséquence de l'immense chance de poser ses valises dans deux laboratoires géniaux au moment où un nouveau champ de recherche devient accessible. En termes de formation de l'esprit, j'ai aussi énormément bénéficié du bain dans l'esprit pasteurien, son bouillonnement intellectuel, ses conférenciers incroyables.

Les paragraphes suivants décrivent brièvement trois publications des années 2009-2011.

1.

Bocquet*, N., Nury*, H., Baaden, M., Le Poupon, C., Changeux, J.-P., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* **457**, 111–114

Cette publication est entièrement reproduite en fin de section

La structure GLIC a été obtenue à une résolution de 2,9 Å à un pH 4,6, pH auquel sa probabilité d'ouverture est maximale. L'architecture globale a confirmé et précisé le riche ensemble de données biochimiques et structurales recueillies auparavant. Les cinq sous-unités sont disposées

en tonneau autour d'un axe de symétrie central qui coïncide avec le chemin de perméation des ions. Chaque sous-unité possède un domaine extracellulaire (ECD) et un domaine transmembranaire (TMD). Le premier consiste en un β -sandwich composé de huit brins reliés par des boucles. Le second est composé de quatre hélices transmembranaires. La deuxième hélice, M2, forme la paroi du pore, bordée par des anneaux de résidus homologues. Le profil du pore indique que le filtre de sélectivité est situé à l'extrémité intracellulaire du pore, tandis que la porte du canal se trouve du côté opposé. Le chemin accessible aux ions, en forme d'entonnoir, est compatible avec une conformation ouverte. J'ai pu modéliser quelques lipides autour de la surface hydrophobe de la protéine (seules les chaînes acyles étaient visibles dans les cartes de densité). Nous avons également pu modéliser six molécules de détergent à l'intérieur du pore, et apporter un faisceau de preuves (mutagenèse, utilisation d'analogues bromés de détergents, simulation) que leur présence n'influence pas la conformation observée. En comparant la structure de GLIC avec celle d'ELIC (Hilf and Dutzler, 2008), un autre homologue procaryote cristallisé dans une conformation fermée, nous avons mis en évidence un mécanisme possible de gating composé de mouvements quaternaires de la protéine (le "twist") ainsi que de déformations tertiaires à l'interface entre le domaine agoniste et le domaine membranaire de GLIC, conduisant à un élargissement au niveau des hélices M2.

Lorsque revinrent les commentaires des Reviewers, nous savions disposer d'une chance d'être publié, bien que les changements à apporter soient majeurs. Un commentaire en particulier m'est resté en mémoire et a inspiré mes projets ultérieurs.

"Certainly a holy grail in the field is to have two images of the same channel, one unambiguously closed, the other unambiguously open (and a full movie of the interconversion). [...] This work is suggestive and interesting but very far from the holy grail"

Par la suite, la partie de mon travail consistant ensuite à cristalliser GLIC à pH neutre, dans une conformation fermée, sera un échec, et j'en garderai l'idée qu'il est plus difficile d'obtenir une seconde conformation qu'une première par cristallographie. Ludovic Sauguet, cristallographe plus rigoureux, y parviendra quelques années après (Sauguet et al., 2013).

2.

Nury, H., Poitevin, F., Van Renterghem, C., Changeux, J.-P., Corringer, P.-J., Delarue, M., and Baaden, M. (2010) One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6275–6280

Seule la première page est reproduite en fin de section

En collaboration avec Marc Baaden (IBPC Paris), nous avons abordé la transition ouvert-fermé en utilisant la dynamique moléculaire. J'ai construit la boîte de simulation grâce à son aide. Toutes les simulations ont été réalisées par Marc Baaden, qui m'a appris comment procéder. J'ai analysé les trajectoires résultantes. La structure cristalline, placée dans une bicouche lipidique entièrement hydratée (~200 000 atomes) à pH 4,6 est soumise à un court cycle d'équilibrage avant que les résidus chargés ne soient placés dans leur état de protonation standard à pH 7,0. Nous avons ensuite poursuivi la simulation pendant 1 μ s. Nous avons observé une fermeture rapide du pore, qui se ferme rapidement, pendant les 50 premières nanosecondes, en raison d'importants mouvements des moitiés extracellulaires des hélices M2 qui constituent la porte du canal. Un mouvement de torsion quaternaire de la protéine entière ("twist") est visible à l'échelle de la microseconde. Nous avons également observé de l'asymétrie. Une des sous-unités initie la transition, via deux séries d'événements : d'abord un réarrangement de son hélice M2 puis une déformation tertiaire dans les 200 nanosecondes suivantes. Puis, séquentiellement, la sous-unité voisine présente également une réorganisation locale de M2 puis globale. Sur la base de ces observations, nous avons émis l'hypothèse d'un modèle en deux étapes (M2 puis global) de type domino (une sous-unité après l'autre) pour les transitions ultrarapides dans la famille pLGIC.

Un après-midi, Jean-Pierre Changeux m'invita (me convoqua ?) dans son bureau pour discuter de l'analyse des trajectoires de dynamique moléculaire. Une partie de ce que nous observions ne lui plaisait guère : la transition était asymétrique, contrevenant à un concept central de l'allostérie développé plusieurs décennies auparavant (Monod, Wyman and Changeux, 1965). J'argumentai tant bien que mal, mais Jean-Pierre et moi je ne boxions pas dans la même catégorie, qu'il s'agisse de rapidité d'esprit, de connaissances de la littérature et ... de rhétorique, et il me mît facilement KO. Jean-Pierre : « Mais voyons prends un peu de recul, qu'aurait pensé Démocrite de ses résultats ? » « ... »



3.

Nury, H., Van Renterghem, C., Weng, Y., Tran, A., Baaden, M., Dufresne, V., Changeux, J.-P., Sonner, J. M., Delarue, M., and Corringer, P.-J. (2011) X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* **469**, 428–431

La publication est reproduite en fin de section

Les anesthésiques généraux sont de petites molécules amphipatiques qui peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique. Ils induisent une perte de sensibilité et de conscience, et sont utilisés depuis 150 ans lors des interventions chirurgicales. Cependant, leur mécanisme d'action moléculaire restait largement inconnu il y a dix ans. La théorie de la perturbation indirecte des membranes qui a été initialement déduite de la corrélation entre la puissance et la répartition des anesthésiques dans l'huile a été lentement remplacée par une théorie faisant intervenir des cibles protéiques spécifiques (Franks, 2008). La principale cible humaine est le récepteur GABA_A. A l'époque de ces travaux, le groupe de Jim Sonner (UCSF) venait de montrer que les anesthésiques généraux modulaient GLIC à des concentrations cliniques (Weng *et al.*, 2010). J'ai alors commencé des essais de co-cristallisation qui ont été couronnés de succès pour deux anesthésiques : le propofol et le desflurane. À partir des structures de 3,2 Å des complexes, nous avons conçu des mutants ponctuels des poches de liaison et caractérisé leurs phénotypes. Aujourd'hui les structures des anesthésiques en complexe avec leurs véritables cibles physiologiques commencent à être décrites (Masiulis *et al.*, 2019; J. J. Kim *et al.*, 2020)

ELIC

Chris Ulens est un pharmacologiste belge dont le laboratoire a longtemps étudié un autre récepteur-canal bactérien nommé ELIC. Au travers d'une collaboration en pointillés, j'ai participé techniquement à deux publications du laboratoire de Chris. La première établit l'activité agoniste du neurotransmetteur GABA sur ELIC ainsi que sa modulation par les benzodiazépines (Spurny *et al.*, 2012). À ce titre, et avant que les récepteurs GABA_A humains n'entrent dans le champ de la biologie structurale, ELIC constituait est une protéine modèle. La seconde publication identifie un site de modulation lipidique accolé à M4 dans le feuillet interne de la bicouche lipidique (Hénault *et al.*, 2019). Ce travail trouve des échos dans l'étude que nous menons en ce moment même avec le récepteur nicotinique du poisson torpille.

Récepteurs nicotiques de l'acétylcholine $\alpha 9\alpha 10$

Cette partie correspond à un projet relancé, pour lequel nous disposons de données préliminaires obtenues par Lefferis Zarkadas.

Au-delà de leur rôle dans la neurotransmission, certains nAChRs sont présents dans des cellules non excitables, par exemple, dans les cellules immunitaires où ils régulent les processus inflammatoires (Gotti and Clementi, 2004; Beckmann and Lips, 2013; Russo *et al.*, 2014). C'est le cas des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$, dont la sous-unité $\alpha 9$ forme soit des homopentamères, soit, en association avec $\alpha 10$, des hétéropentamères (Indurthi *et al.*, 2014). Les récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ semblent être des acteurs importants dans les voies pro-inflammatoires (Hecker *et al.*, 2015; Richter *et al.*, 2016; Zakrzewicz *et al.*, 2017) et par conséquent des cibles possibles dans le traitement de la douleur chronique. De plus, ils sont la cible de toxines extraites des cônes marins, et c'est la promesse que des molécules dérivées de ces toxines puissent un jour être des agents thérapeutiques (Vincler *et al.*, 2006; McIntosh *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2017) qui stimule le champ de recherche.

Une première α -conotoxine, Vc 1.1, issue du cône australien chasseur d'escargot *Conus victoriae*, a démontré des effets analgésiques et anti-inflammatoires robustes dans trois modèles animaux. Vc 1.1 a toutefois échoué dans un essai clinique de phase II mené dans les années 2000. À l'époque, sa cible moléculaire était inconnue, mais il a été démontré par la suite que le composé était un inhibiteur du $\alpha 9\alpha 10$ nAChR. Son affinité pour récepteur humain était significativement moins bonne que pour celui des rongeurs, ce qui explique que les bons résultats des études précliniques n'aient pas été reproduits chez l'homme. L'intérêt pour les récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ persiste toutefois, probablement nourrie par la crise des opioïdes aux Etats-Unis, qui stimule la recherche de nouveaux anti-douleurs agissant via des mécanismes totalement différents. Kineta, une petite société de biotechnologie, a commencé à administrer un autre antagoniste des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$, dérivé de la toxine RigA de *Conus regius*, dans un essai clinique de phase I en décembre 2020, en partenariat avec Genetech, pour le traitement de la douleur neuropathique chronique. Notons aussi que les récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ sont également considérés comme des cibles attractives pour le traitement des troubles de la perte auditive, en raison de leur distribution sélective sur les cellules ciliées cochléaires et vestibulaires (Elgoyhen, Katz and Fuchs, 2009).

Les récepteurs $\alpha 9$ ou $\alpha 9\alpha 10$ s'expriment peu — voire pas du tout — dans des systèmes hétérologues (Verbitsky *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2004; Filchakova and McIntosh, 2013; Boffi *et al.*, 2017), ce a longtemps limité la recherche les concernant aux études fonctionnelles. Aucune tentative d'expression à grande échelle n'a encore été rapportée, et les connaissances structurales sont limitées au domaine extracellulaire soluble de la sous-unité $\alpha 9$ (Zouridakis *et al.*, 2019). Un des étudiants ayant participé au travail sur le domaine extracellulaire est devenu post-doctorant dans mon équipe, et c'est sous son impulsion que nous nous sommes intéressés aux récepteurs $\alpha 9\alpha 10$. Nous avons initialement tenté de contourner l'absence d'expression des récepteurs en construisant des récepteurs chimériques $\alpha 9/5$ -HT3 produits soit dans des cellules d'insectes soit dans des cellules mammifères. Le projet est allé assez loin, mais nous l'avons stoppé après avoir obtenu les premières reconstructions 3D issues d'images de cryomicroscopie électronique. En effet ces reconstructions montraient un pentamère pourvu d'un domaine membranaire (celui du récepteur 5-HT3) normal, et d'un domaine extracellulaire (celui d' $\alpha 9$) largement déformé, ouvert comme une corolle, comme si les sous-unités s'assemblaient mal (figure 11 ci-dessous).

L'été dernier cependant, le groupe de David Bredt a identifié une chaperonne et un ensemble de plusieurs sous-unités accessoires qui ont permis d'obtenir une expression largement supérieure de récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ dans des cellules de mammifères (Gu *et al.*, 2020). Cette étude fonctionnelle change peut-être la donne pour la biologie structurale : nous pouvons imaginer

exprimer simultanément les 4 transgènes (2 sous-unités, la chaperonne et une sous-unité accessoire) pour obtenir des structures de $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs et de leurs complexes avec des ligands ou toxines. Pour relever le défi d'exprimer simultanément 4 gènes, nous avons choisi d'utiliser des lignées de cellules HEK obtenues par transduction lentivirale (Elegheert *et al.*, 2018) (voir la partie méthodes page 13).

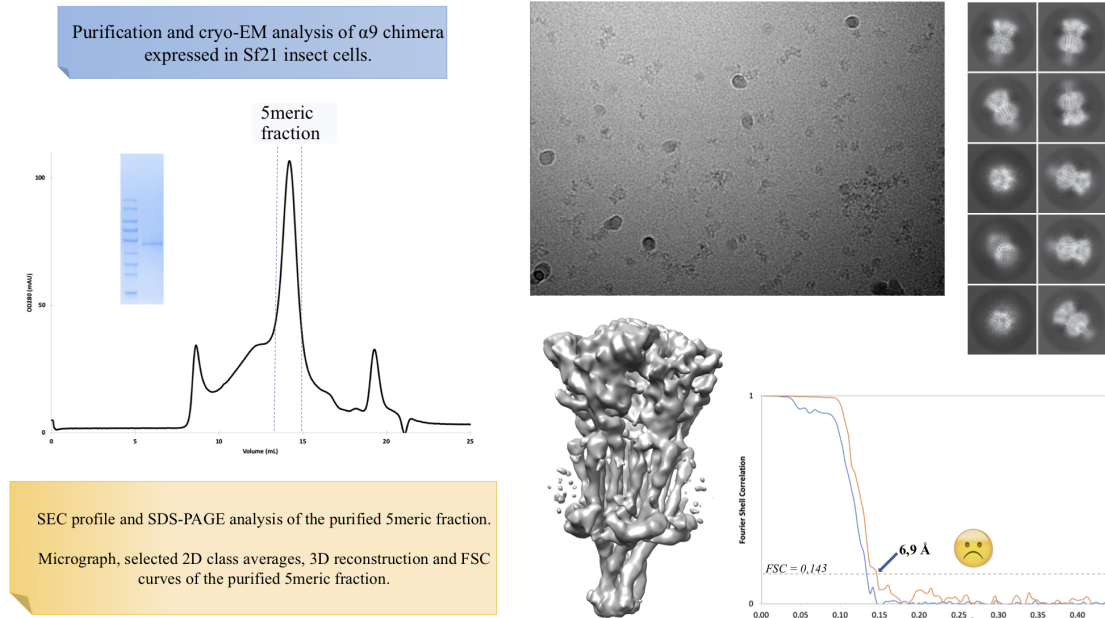


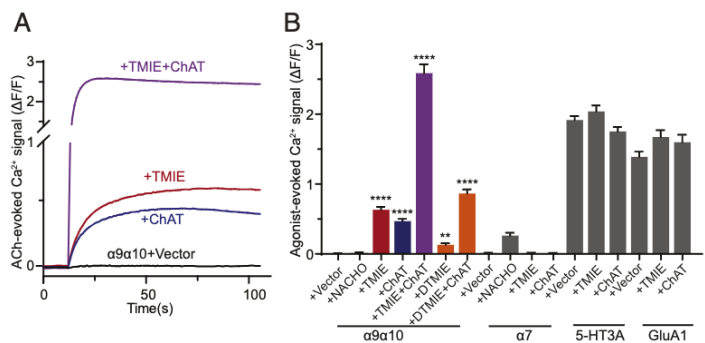
Figure 11. Etude structurale préliminaire d'un récepteur-canal chimérique $\alpha 9/5$ -HT3

Une construction, dans laquelle l'ECD du récepteur nicotinique $\alpha 9$ et les domaines membranaire et intracellulaire du récepteur 5-HT3 ont été fusionnés, s'exprime correctement en cellules d'insecte puis se purifie sous forme pentamérique en détergent (à gauche). Un jeu de données sur le microscope 300 kV Cryoarm de Bruxelles permet d'obtenir une reconstructions de mauvaise qualité (en bas). La caractéristique étonnante de cette reconstruction est une dissociation des interfaces entre sous-unités dans l'ECD, alors que le domaine membranaire semble correctement assemblé.

Le projet, dont les prémices sont menées en ce moment par Lefteris Zarkadas, et de générer des lignées cellulaires exprimant le chaperon obligatoire choline acétyltransférase (ChAT) et soit uniquement la sous-unité $\alpha 9$, soit les deux sous-unités $\alpha 9$ et $\alpha 10$ équipées d'étiquettes de purification différentes. Les homo- et hétéro-pentamères seront extraits et purifiés par affinité à partir de ces pools cellulaires, en présence de ligands lors des premières étapes pour favoriser l'assemblage. Comme la présence des sous-unités accessoires TMIE, TMEM132e, TMEM100 et TNFRSF10a a un effet synergique avec ChAT pour augmenter la fonction des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ (Gu *et al.*, 2020), nous chercherons également à obtenir des complexes d'homopentamères $\alpha 9$ nAChRs ou d'hétéromères $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs avec des sous-unités accessoires (pour le moment une seule).

Figure 12. Chaperones pour l'expression des récepteurs $\alpha 9\alpha 10$ nAChRs

Extrait de (Gu *et al.*, 2020) montrant les différences de réponse à une stimulation par l'acétylcholine lors d'un essai fonctionnel par fluorescence (FLIPR, basé sur un fluorophore sensible au potentiel de membrane). Noter la courbe et la barre violette, indiquant un signal aussi fort qu'avec le récepteur 5-HT3 lorsque $\alpha 9$, $\alpha 10$, ChAT et TMIE sont co-exprimés.



Le récepteur nicotinique musculaire

Cette partie correspond à un projet en cours, non encore sanctionné par une publication (mais nous n'en sommes pas loin j'espère !), et mené par Lefferis Zarkadas et John Baenziger, avec l'aide d'Eva Pebay-Peyroula pour les constructions de modèles.

Les adjectifs apposés au récepteur nicotinique de l'acétylcholine de la raie électrique (Tc_nAChR) soulignent la place centrale qu'il a longtemps occupé parmi les récepteurs canaux pentamériques : *founding father*, *arche-* ou *prototypical member*. Il a sa place dans les *textbooks* tels que le Stryer, bref il est incontournable. La raison en est que ce récepteur fut longtemps la source principale de récepteur pentamérique pour la biochimie. En effet, l'organe électrique de la raie électrique, qui peut représenter 1/3 du poids d'un animal adulte, se compose pour environ moitié de récepteurs nicotiniques! Ce récepteur se compose de 4 sous-unités juxtaposées dans l'ordre α - β - δ - α - γ , et il est homologue au récepteur nicotinique musculaire de l'humain. Côté structure, l'analyse de micrographies électroniques de nanotubes de Tc_nAChR a permis, dès 2003, au célèbre microscopiste britannique Nigel Unwin de proposer un modèle atomique (Miyazawa, Fujiyoshi and Unwin, 2003; Unwin, 2005, 2013), premier et quelques années seul modèle de récepteur canal pentamérique entier.

J'ai longtemps et à tort un peu ignoré ce récepteur de la raie électrique. D'une part les densités semblant peu détaillées pour une résolution annoncée à 4 Å, d'autre part mon initiation à ces récepteurs dans le cercle pasteurien plutôt critique, m'ont fait préférer les analyses des premières structures bactériennes puis des homopentamères eucaryotes. L'idée de faire un crochet du côté de la raie électrique s'est néanmoins imposée petit à petit, à mesure que la microscopie électronique devenait mon activité principale, et surtout grâce à un collaborateur, John Baenziger.

J'ai connu John en 2006, à Grenoble, alors qu'il passait en France quelques mois d'un congé sabbatique octroyé par l'Université d'Ottawa où il est professeur. Nous nous sommes ensuite côtoyés à Paris en 2009 (deuxième congé sabbatique, dans l'équipe de Pierre-Jean Corringer), et enfin il a posé ses valises au laboratoire en 2019, à l'occasion d'un troisième congé sabbatique financé en partie par l'Université Grenoble Alpes. John est un grand spécialiste du récepteur nicotinique musculaire, qu'il a étudié à la fois sur son flanc fonctionnel et sur son flanc biochimique (daCosta and Baenziger, 2009; daCosta *et al.*, 2013; Baenziger *et al.*, 2015; Thompson, Domville and Baenziger, 2020). John nous a appris à purifier le Tc_nAChR, solubilisé en cholate, par une chromatographie d'affinité avec une résine maison fonctionnalisée par de la bromo-choline. Il a adapté un test biochimique permettant d'évaluer la fonctionnalité des récepteurs. Après reconstitution en nanodisque, nous avons obtenu des structures du récepteur en l'absence de ligand, et en présence de carbamylcholine, de nicotine, tout cela en environ un an. Une première publication décrivant ces résultats est en cours d'écriture... depuis presque un an également (et entre temps une structure du récepteur inhibé par la bungarotoxine a été publié (Rahman *et al.*, 2020)), mais le manuscrit reste trop préliminaire pour être inclus ici.

Purification

A partir de 150 g d'organe électrique, environ 10 mg de récepteurs sont obtenus après solubilisation dans 1% sodium cholate puis purification par affinité. Ces récepteurs se répartissent entre pentamères et dimères de pentamères lors d'un passage sur une colonne de chromatographie d'exclusion des tailles, car le récepteur peut naturellement dimériser via la formation d'un pont disulfure dans le domaine C-terminal de la sous-unité δ . Afin d'obtenir une homogénéité suffisante, nous favorisons la rupture de ce pont via un ajout de 15 mM de DTT, puis isolons les pentamères avant de procéder à une ré-incorporation en nanodisques de lipides (ratio nAChR:MSP de 1:5) sans ajout de lipides car le tampon de purification contient 1.05 mM

d'asolectine. La figure ci-dessus présente les chromatogrammes d'exclusion des tailles après la colonne d'affinité, l'ajout de DTT, puis la reconstitution.

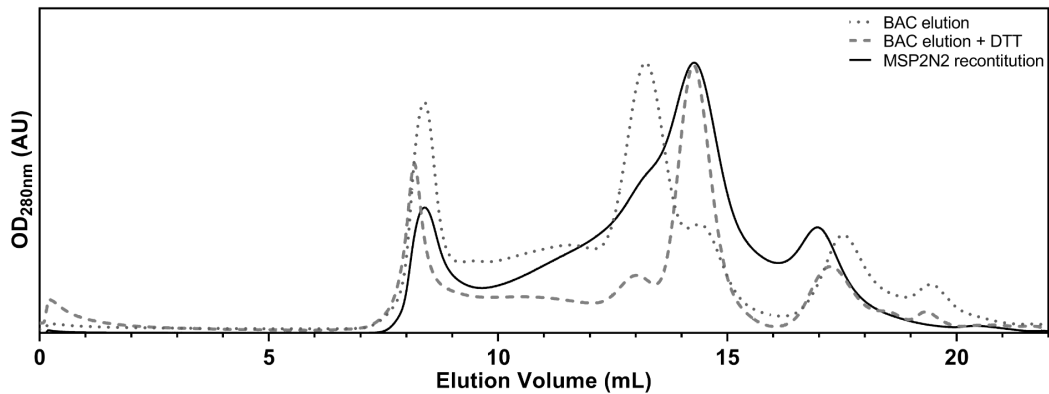


Figure 13. Profils SEC du récepteur nicotinique du poisson Torpille

Profil d'éluion des récepteurs nicotiniques du poisson Torpille, sur une colonne Superose 6 10/300. Les pentamères sont obtenus vers 14 mL, les dimères de pentamères vers 13 mL. Après colonne d'affinité (BAC pour bromoacetylcholine) un mélange entre ces deux espèces existe, déplacé vers les pentamères par l'ajout de DTT.

Structures obtenues

Nous avons obtenu trois reconstructions de bonne qualité, en l'absence de ligand d'une part, et avec deux agonistes différents (un bon agoniste, la carbamylcholine, et un mauvais agoniste, la nicotine).

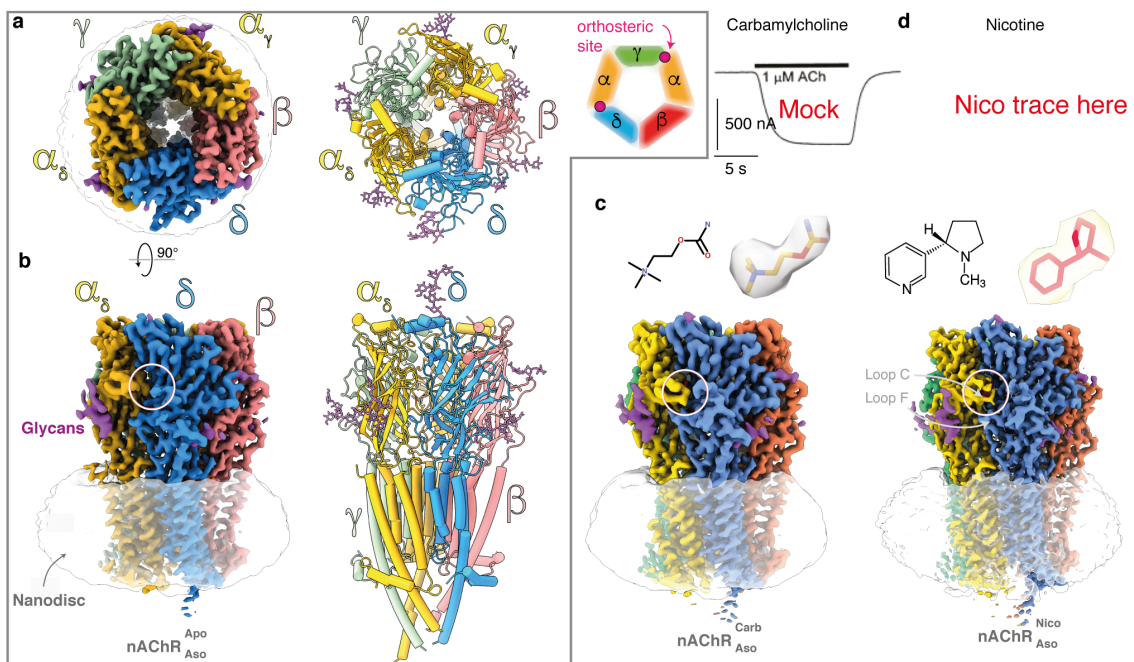


Figure 14. Structures du nAChR du poisson torpille.

(a et b) Vues de dessus et de côté de la principale reconstruction cryo-EM de la forme apo du Tc_nAChR (résolution 2.9 Å) colorée par sous-unité, la densité du nanodisque étant représentée par une surface blanche transparente (à gauche). Représentation de la structure sous forme de carton avec les glycanes sous forme de bâtonnets (à droite).

(c et d) Vues latérales des reconstructions cryo-EM pour les complexes avec la carbamylcholine (résolution 3.1 Å) et la nicotine (résolution 2.3 Å!). La formule de l'agoniste et la densité électronique autour d'un agoniste sont indiquées pour chaque structure. Les réponses fonctionnelles à ses deux agonistes doivent encore être mises en page pour compléter cette figure inachevée.

Les récepteurs nicotiques d'insectes

Cette partie correspond à un projet futur. Après une mise en contexte, j'y copie une demande de financement soumise à l'ANR en 2021 par un groupe de trois équipes: celle de Pierre Charnet (IBBM Montpellier), celle de François Dehez et Christophe Chipot (LPCT Nancy), et la nôtre.

Pendant des siècles, des extraits de tabac furent employés comme insecticides. Toutefois la nicotine comme les molécules qui en sont dérivées pénètrent mal les systèmes nerveux des insectes, ce qui limite leur utilité pour l'agriculture. C'est donc à partir du squelette de la nithiazine, synthétisée en 1978, qu'ont été optimisés les insecticides néonicotinoïdes (neonic). Les neonic sont des modulateurs orthostériques des récepteurs nicotiques. Leur usage débute dans les années 1990 et prend de l'essor pour atteindre 25-30% de parts du marché des insecticides (Casida, 2018; Jeschke, 2021). Cet essor repose sur trois "avantages" des neonic : ils éliminent efficacement les insectes, présentent une bonne activité systémique (c'est-à-dire qu'ils sont bien transportés depuis le sol vers les différents organes des plantes que les ravageurs consomment), leur toxicité pour les mammifères est faible. Par exemple, l'IC₅₀ de l'imidaclopride pour les récepteurs nicotiques d'insecte est de l'ordre de 5 nM contre plus de 2 µM chez les mammifères, tandis la dose létale de 18 mg/kg chez l'abeille contre ~450 chez les mammifères (Casida, 2018).

Les populations d'insectes diminuent dans des proportions catastrophiques ; la masse d'insectes volants a été divisée par quatre en seulement trois décennies (Hallmann *et al.*, 2017). Les neonic participent à cette baisse effrayante, et 3 composés (imidaclopride, thiamethoxan, clothiadinin) considérés comme trop nocifs pour l'environnement sont interdits en Europe, et deux de plus le sont en France depuis 2018. Toutefois en 2020, une baisse des rendements de la culture de betterave, liée à la prolifération de pucerons vecteurs du virus de la jaunisse, a conduit à un revirement législatif permettant un usage encadré des neonic dans le but de préserver la filière sucrière. Dans les champs de betterave, et dans de nombreux autres cas, les neonic sont souvent mis en oeuvre sous forme d'enrobage de la graine. 1.6% à 20% des neonic sont absorbés par les plantes en développement, et le reste demeure dans l'environnement (Wood and Goulson, 2017). Bien que les neonic soient photosensibles et rapidement dégradés en milieu aqueux (mais seulement en surface), une accumulation graduelle intervient dans les champs traités chaque année (la betterave se cultive en rotation, avec une fréquence de 4-5 ans). Par ailleurs, les composés sont aussi relargués dans l'environnement via le pollen ou la poussière issue de la moisson.

Les récepteurs nicotiques sont les principaux médiateurs de la neurotransmission rapide excitatrice chez les insectes. Ces récepteurs sont formés par un ensemble de sous-unité (10 chez la drosophile, 11 chez l'abeille, 15 chez le vers à soie comme chez l'homme tandis que le vers *C. elegans* en compte 27). Chez l'abeille par exemple, on dénombre 9 sous-unités α (qui possède un motif cysteine-cysteine dans la boucle C recouvrant le site agoniste) et 2 sous-unités β . La plupart des récepteurs fonctionnels identifiés jusqu'ici sont des hétéropentamères, mais leur composition commence seulement à être connue. En effet, les récepteurs nicotiques d'insectes ont longtemps eu la réputation de ne pas, ou très mal, s'exprimer en systèmes hétérologues : on en connaît donc mal les assemblages, la pharmacologie, la distribution. Vu de mon couloir, ces récepteurs étaient hors du champ de la biologie structurale... jusqu'à l'année dernière. Deux publications de l'été 2020 montrent que la co-expression de trois chaperonnes permet d'obtenir une belle expression de surface de récepteurs nicotiques d'abeille, de bourdon, de mouche (Ihara *et al.*, 2020) et de poux du saumon (Rufener *et al.*, 2020) (qui n'est pas un insecte mais un arthropode) en ovocyte de xénope. Ces chaperonnes permettent-elle de surexprimer ces récepteurs pour la biologie structurale ? C'est ce que nous proposons d'explorer.

Par ailleurs, notre équipe a acquis le savoir-faire pour purifier des récepteurs nicotiniques natifs, grâce à la collaboration avec John Baenziger mentionnée précédemment. Ce savoir-faire permettrait-il de purifier des récepteurs natifs d'insectes ? Je souhaite l'explorer grâce en tentant de reproduire le type de purification réalisés avec la raie électrique, mais à partir de grandes quantités de nymphes de mouches soldats (fournies par Ali Hosseini, entomologiste chez Protix). Il y a très peu de données permettant de prévoir le rendement (Tomizawa, Latli and Casida, 1996), mon optimisme table sur 10-100 μg de récepteur isolés avec 100 grammes d'insectes. Même en cas de succès dans la purification, nous obtiendrons un abominable mélange de différents récepteurs, et il est très incertain que l'analyse de données de cryoEM permettent de les séparer *in silico*. Disposer des marqueurs d'un certain nombre de sous-unités serait alors un avantage certain. Ce second volet de purification de récepteurs natifs ne fait pas partie du projet soumis à l'ANR.

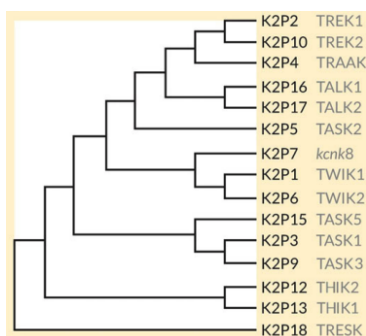
La préparation en amont de ce projet a amené une évolution significative de nos systèmes d'expression. Il nous faut en effet un système compatible avec l'expression simultanée de plusieurs transgènes, typiquement de 4 à 7 (3 chaperonnes et 1-4 sous-unités). Comme expliqué plus haut, nous avons plutôt choisi d'implanter au laboratoire un système lentiviral pour cellules HEK (Elegheert *et al.*, 2018). Des essais menés à partir de janvier 2020, utilisant le récepteur 5-HT3AB comme protéine test, sont encourageants.

Enfin, au cours de discussions préliminaires, il a semblé pertinent de ne pas limiter nos essais aux récepteurs nicotiniques. En effet, les insectes possèdent également des récepteurs GABA_A capables de former des homopentamères et également ciblés par une large d'insecticides. Pierre Charnet nous a donné un ensemble de clones de GABA/RDL provenant de l'abeille, du puceron et du varois (un petit acarien qui suce le sang des abeilles). Pour ces gènes-là, formant des récepteurs fonctionnels sans recours à des protéines chaperonnes, tant les cellules d'insectes que les cellules mammifères sont des options viables pour l'expression.

Les pages ci-après sont copiées d'une demande ANR. Seule la description scientifique du programme de recherche est incluse, j'ai enlevé les parties décrivant le consortium, les tableaux de dépenses et autres diagrammes de Gantt.

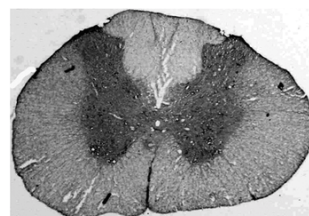
Canaux potassium à deux domaines pores

Cette partie décrit un projet en cours, mais actuellement sans financement. Il a été mené d'abord par Orso Subrini (postdoc), et l'est maintenant par Céline Juillan Binard (technicienne) avec l'aide de Leferis Zarkadas (postdoc) pour la cryoEM. Je suis hésitant sur son futur, si nous n'obtenons pas de structure d'ici la fin de l'année.

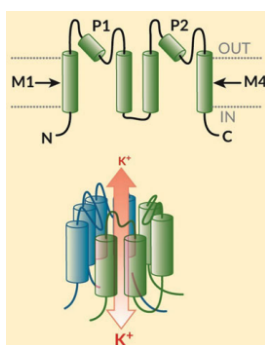


La famille des canaux potassium à deux domaines pore (famille K2P) comprend chez l'homme 15 sous-unités, qui s'assemblent en homo- ou hétérodimères pour former des canaux ioniques perméables au potassium et régulés par une variété de stimuli (Feliciangeli *et al.*, 2015). Par exemple, TREK1 est sensible au pH, à la température, à divers médicaments solubles, au PIP₂, etc. Les canaux K2P contribuent aux courants de fond dans les tissus excitables comme non-excitables ; leur activité pousse le potentiel de membrane vers le potentiel d'équilibre du potassium et à ce titre régule l'excitabilité cellulaire.

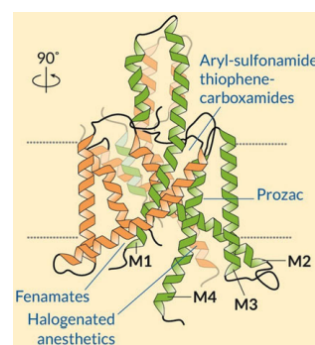
Il n'existe actuellement sur le marché aucun médicament visant sélectivement un canal K2P, mais certains membres de la famille sont des cibles actives dans les programmes de développement de médicaments pharmaceutiques. TREK1, par exemple, est à lui seul une cible potentielle pour l'arythmie cardiaque, la douleur neuropathique et la dépression ! TASK-3 est surexprimé certaines tumeurs responsables de cancers du sein, de la prostate, des poumons ainsi que de mélanomes (Comes *et al.*, 2015). La plupart des connaissances physiologiques et structurales concernent les seuls canaux homomériques. Néanmoins, une littérature croissante décrit l'existence, les particularités et la pertinence physiologique des canaux hétéromériques. Au cours des dernières années, il a par exemple été démontré que TREK1 peut former des hétérodimères avec TREK2 (Lengyel, Czirják and Enyedi, 2016; Levitz *et al.*, 2016), avec TRAAK (Blin *et al.*, 2016), avec TWIK (Hwang *et al.*, 2014) (cela a été contesté), et avec des mutants de la sous-unité TRESK plus éloignée, les hétérodimères dysfonctionnels provoquant alors la migraine (Royal, Perrine *et al.*, 2018).



TRESK expression in the spinal cord



Les structures cristallographiques des homomères TRAAK (Brohawn, del Marmol and MacKinnon, 2012; Brohawn, Campbell and Mackinnon, 2013), TWIK1 (Miller and Long, 2012), TREK2 (Dong *et al.*, 2015), TREK1 (Lolicato *et al.*, 2017), TASK1 (Rödström *et al.*, 2020) sont connues, ainsi que depuis l'été dernier la structure cryoEM de TASK2 (Li, Rietmeijer and Brohawn, 2020). Chaque sous-unité possède 4 segments transmembranaires et deux boucles de pores rentrantes.



Dans tous les cas sauf celui de la TWIK1, les sous-unités sont disposées comme un dimère à domaine échangé (maximisant la zone d'interface, par exemple ~5000 Å² dans TRAAK contre ~2000 Å² dans TWIK1). Un capuchon extracellulaire couvre l'entrée du pore et les portails latéraux sont exposés à la bicouche. TREK1 et TREK2 présentent une variété de sites de liaison, pour le principal métabolite du Prozac (un inhibiteur), pour les anesthésiques volatils (activateurs), pour

les ML335 et ML402 (activateurs), qui ensemble illustrent la modulation allostérique complexe en jeu dans la famille des canaux K2P. Le(s) mécanisme(s) de porte du canal K2P est(ont) encore débattu(s) (McClenaghan *et al.*, 2016) et il se pourrait que les différents stimuli aient un impact sur l'activité des différentes portes.

De l'expression à la cristallisation de TREK1

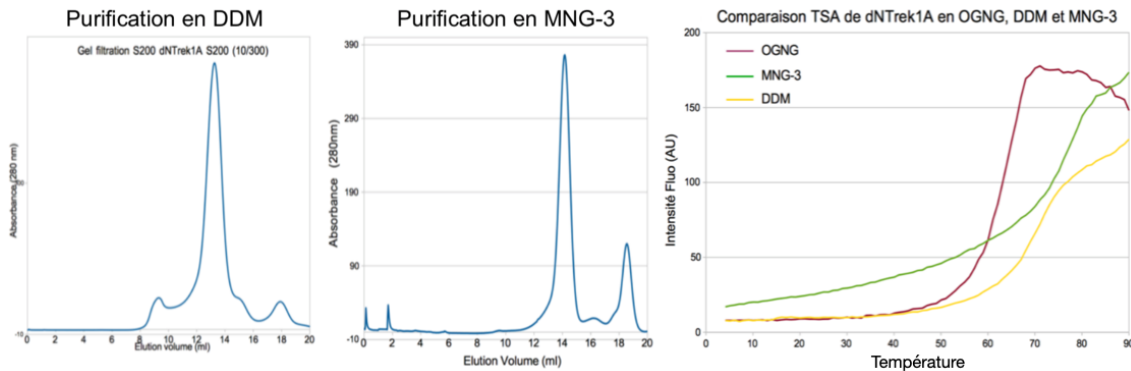


Figure 15. Comportement biochimique de TREK1

Malgré des jolis profils de chromatographie par exclusion de taille, pour TREK1 purifiée en DDM ou en MNG3, ces détergents ne permettent pas la croissance de cristaux diffractants. A droite, la comparaison des stabilités thermiques de TREK1 dans 3 détergents différents indique une bonne stabilité dans tous les cas, avec tout de même un avantage pour le DDM.

J'ai commencé à m'intéresser à TREK1 en 2014, lorsqu'une société pharmaceutique nous a contactés pour résoudre sa structure en complexe avec des molécules issues de leurs efforts de *screening*. Grâce au talentueux Orso Subrini, et en partant d'un gène synthétique, nous avons obtenu des cristaux puis une structure à 3,6 Å de résolution en deux ans environ - et avant que la structure de TREK1 ne soit publiée et que nous ne soyons doublés. La structure de Lolicato *et al.* a été obtenue à une meilleure résolution (il y avait des zones de franc désordre dans notre carte de densité) et avec des ligands.

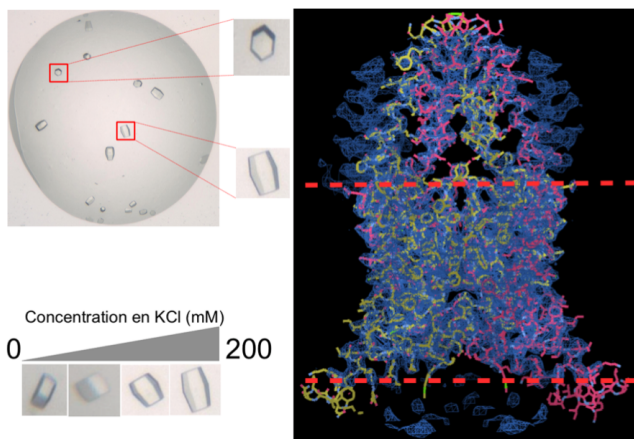


Figure 16. Cristaux et structure de TREK1

Exemple d'une goutte avec des bons cristaux, diffractant aux alentours de 3.5-4 Å. La qualité (et la taille) des cristaux était corrélée à la quantité de KCl dans la solution réservoir. A droite, une vue dans le plan de la membrane de la densité électronique obtenue.

Hétéromères TREK1-TREK2

Pendant le contrat industriel, nous avons aussi, au début sur un coin de paille, commencé à exprimer quelques hétéromères de TREK1, dans l'espoir que ce projet annexe déboucherait sur une publication (le travail principal sur TREK1 n'étant pas destiné à l'être). L'assemblage entre sous-unités semble le principal moyen choisi par l'évolution pour créer une diversité fonctionnelle chez les protéines membranaires ("*soluble proteins have domains, membrane proteins are*

oligomers"). La compréhension des principes qui sous-tendent l'assemblage oligomérique présente un intérêt général, que peut-être nous pouvons aborder au travers des hétérodimères de TREK (comme des hétéropentamères des récepteurs 5-HT3 et nicotiniques).

Après des premiers essais de co-expression, qui fonctionnaient mais conduisent à la présence de plusieurs populations de protéines (typiquement des homomères TREK1-TREK1, des homomères TREK2-TREK2 et des hétéromères TREK1-TREK2), nous avons fait le choix d'exprimer des constructions tandem dans lesquelles les deux sous-unités sont attachées par un polypeptide. Les hétéromères obtenus sont homogènes, et le rendement meilleur qu'avec une sous-unité isolée (la construction tandem favorise j'imagine l'assemblage quaternaire qui autrement est une étape limitante dans l'expression). Comme des essais de cristallisation n'ont pas permis d'identifier des conditions prometteuses, nous cherchons maintenant à obtenir la structure de l'hétéromère par cryoEM.... Sachant que la masse moléculaire de la construction tandem est de 61 kDa. Un premier jeu de données en détergent, sur un microscope Krios, n'a pas permis de résoudre la structure. Nous avons alors décidé, d'une part de reconstituer l'hétéromère en nanodisques et d'autre part d'ajouter un domaine de fusion pour différencier les deux sous-unités. Le choix de passer en nanodisque a été en partie guidé par la thermostabilité en présence de lipides (voir ci-contre). Le domaine BRIL (Chun *et al.*, 2012) a été inséré entre les hélices 2 et 3 de TREK1, sur la base de l'alignement de séquence avec TRESK qui possède naturellement un gros domaine soluble à cet endroit. La construction TREK1-(BRIL)-TREK2 garde un bon comportement biochimique (Figure 17b, c) et des jeux de données cryoEM ont été collectés (Figure 18).

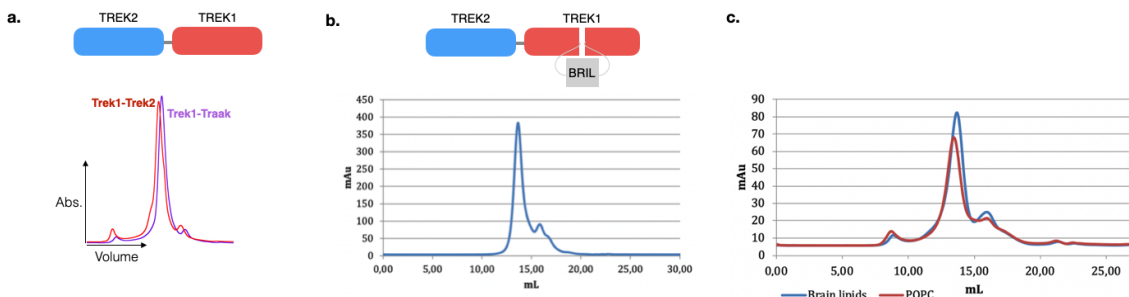
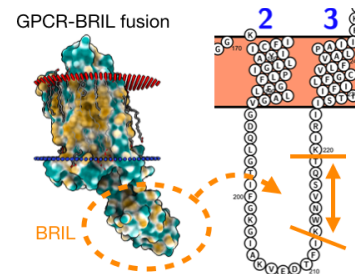
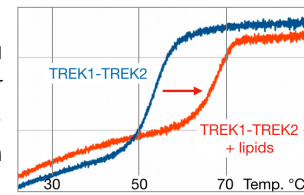


Figure 17. Comportement biochimique des hétéromères TREK1-TREK2

a. Profils SEC, sur une colonne Superdex 200, de deux constructions de fusion de l'hétéromère K2P produites dans des cellules d'insecte, solubilisées avec de l'OGNG puis purifiées par affinité.,
b. Profil SEC de l'hétéromère TREK1-(BRIL)-TREK2 reconstitué dans des nanoparticules de saposine.
c. Profils SEC de l'hétéromère TREK1-(BRIL)-TREK2 reconstitué dans des nanodisques à base de MSP, dans deux types de lipides. C'est typiquement ce type d'échantillon que nous utilisons en ce moment pour l'imagerie. Néanmoins, les profils d'élutions indiquent que l'homogénéité des constructions en tandem est bonne dans tous les cas.

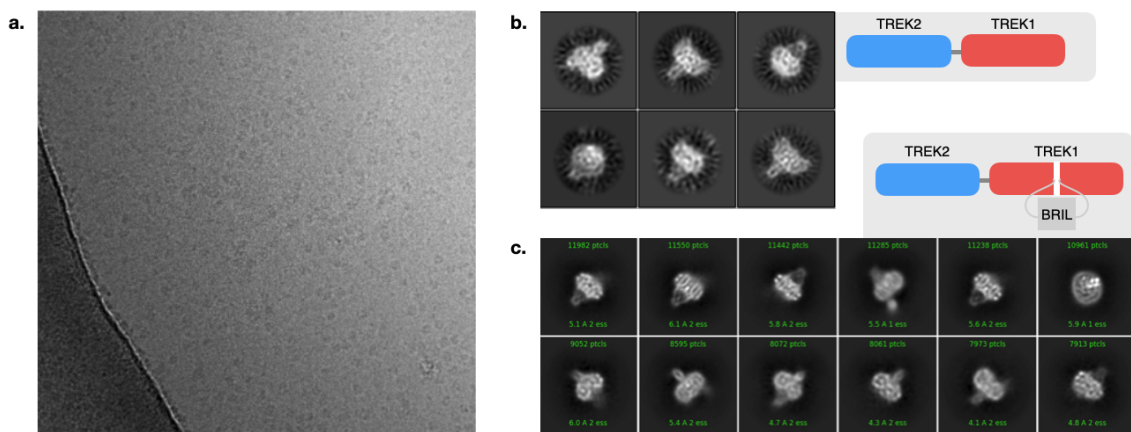


Figure 18. Essais de cryoEM avec les hétéromères TREK1-TREK2

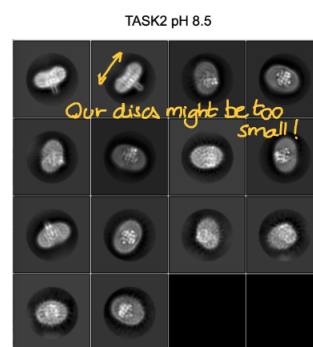
- a. Micrographie de TREK1-(BRIL)-TREK2 dans des nanodisques. La densité de particules est bonne.
- b. Moyennes 2D de l'hétéromère TREK1-TREK2 en présence d'OGNG.
- c. Moyennes 2D de TREK1-(BRIL)-TREK2 dans les nanodisques. Le domaine BRIL flou est bien visible dans la 4ème classe.

Meilleures données cryoEM à ce jour

Les meilleures données obtenues ont été enregistrées pendant l'été 2020 au microscope Krios CM01 de l'ESRF. La protéine d'intérêt est ici TREK1-(BRIL)-TREK2 reconstituée dans un nanodisque formé avec des lipides polaires de cerveau et la protéine MSP1E3D1. À partir d'environ 6000 images, nous parvenons à une reconstruction 3D de basse résolution (celle-ci est d'ailleurs difficile à estimer, disons autour de 5 Å).

Le traitement de ce jeu de données, par ailleurs assez frustrant car j'ai plusieurs fois cru qu'une bonne reconstruction en émergerait sans que cela ne se concrétise jamais, a été l'occasion de tester plusieurs subtilités techniques. Nous avons appris comment bien passer de Cryosparc à Relion, et vice versa ; comment utiliser des groupes optiques afin de prendre en compte les larges "beam shifts" utilisés lors de l'acquisition ; comment utiliser l'expansion de symétrie puis des classifications focalisées sur une seule sous-unité pour tenter de reconnaître TREK1 de TREK2.

Une difficulté rencontrée tient à une apparente interaction entre le pourtour du nanodisque et le canal ionique. En effet, lorsqu'un affinement progresse correctement, la densité correspondant au nanodisque -ou de la micelle- est progressivement moyennée à de basses valeurs, et elle « disparaît » des cartes de densité au contour qui permet de bien voir la protéine d'intérêt. Cet effet, que les anglophones qualifient de "averaging out" est dû à l'absence de contrainte entre la protéine et le pourtour du disque. La protéine est libre de tourner et dans une certaine mesure de translater au sein du disque. Ici, il semble que le disque soit suffisamment étroit pour que des interactions spécifiques aient lieu entre TREK et les protéines MSP. Les programmes d'affinement ont alors du mal à ne sélectionner que le signal de la protéine et nous obtenons des reconstruction en basse résolution dans lesquels figurent à la fois le disque et le canal ionique. L'usage de masque ou la soustraction de densité n'ont pour le moment pas permis d'améliorer tellement cette situation. Comme les disques utilisés sont nettement plus petits que ceux utilisés pour TASK-2 (moyennes 2D reproduites ci-contre, à comparer aux moyennes 2D de la figure 18). Supposant que cette petite taille pouvait être à l'origine des problèmes rencontrés pendant le traitement de données, Céline Juillan-Binard et Leferis Zarkadas ont, ces derniers mois, produit et regardé au microscope des disques plus gros, pour le moment sans grand succès.



La figure ci-dessous donne quelques indications quant au traitement de données, par comparaison avec celui effectué pour l'unique membre de la famille de structure résolue par cryoEM (TASK2) (Li, Rietmeijer and Brohawn, 2020). Notre cas est plus complexe, puisqu'au défi posé par la petite taille de la protéine, nous ajoutons le défi posé par l'asymétrie, avec des sous-unités qui se ressemblent grandement. Notre stratégie basée sur la présence du domaine de fusion BRIL, inséré entre l'hélice 2 et l'hélice 3 seulement dans TREK1, est ici mise en échec. En effet, BRIL est flexible par rapport au canal ionique, comme l'indiquent les moyennes de classes 2D, et en conséquence sa densité "disparaît" dès les premières reconstructions 3D. Nous travaillons à présent d'une part à rigidifier cette fusion en raccourcissant progressivement les peptides liant les deux protéines (l'idée est d'avoir une continuité d'hélices entre TREK1 et BRIL) ; d'autre part à rendre la fusion plus volumineuse grâce à l'adjonction d'un domaine Fab et d'un nanobody se fixant de manière spécifique et très affine sur BRIL (Mukherjee *et al.*, 2020). Ces protéines partenaires de haute affinité sont obtenues via une collaboration avec le groupe de Kossiakoff, qui promeut leur usage en tant que partenaires généralistes, facilitant l'acquisition de données par cryoEM dans une large gamme de cas possible. Il ne faut pas oublier que BRIL a très souvent été utilisé en fusion avec des GPCRs (Chun *et al.*, 2012), et qu'il y a sans doute plusieurs dizaines de laboratoires ayant dans leurs tiroirs de telles fusions.

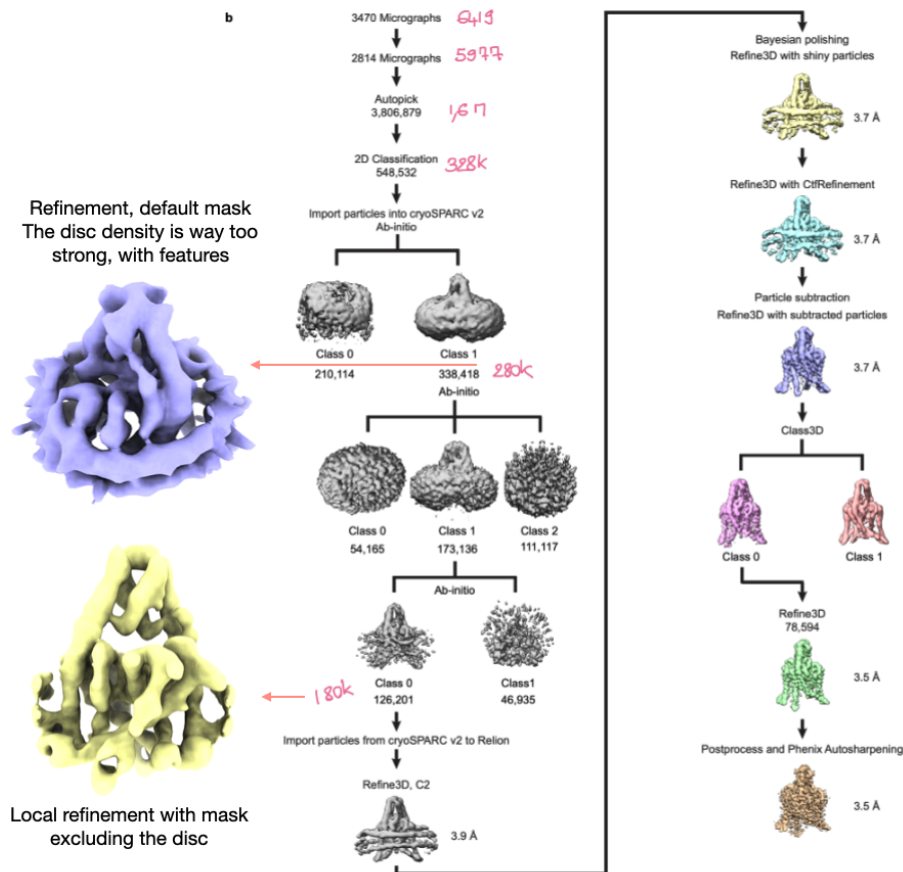


Figure 19. Comparaison du traitement de données avec TASK-2

Le schéma de traitement de données est reproduit de (Li, Rietmeijer and Brohawn, 2020), les annotations manuscrites indiquent les nombres équivalents pour notre jeu de données et indique en creux des pistes d'amélioration (plus grande densité, meilleures classifications, ...). Les reconstructions en violet et jaune sont celles de l'hétéromère. Je ne vois pas une différence si grande entre la violette et l'étape en bas à gauche pour TASK-2.

Des premières tentatives décevantes avec un fragment d'anticorps

Avant de nous résoudre à raccourcir la liaison entre BRIL et TREK1, ce qui implique de revenir à l'étape de clonage, nous avons tenté d'imager un complexe entre notre construction actuelle et le Fab(BRIL). Un mélange légèrement sur-stoichiométrique a été réalisé juste avant la préparation de grilles de microscopie électronique. Las, dans les images correspondantes, si on peut imaginer résoudre la structure du Fab (Figure 20b), la rigidité du complexe n'est clairement pas satisfaisante (première classe de la Figure 20a).

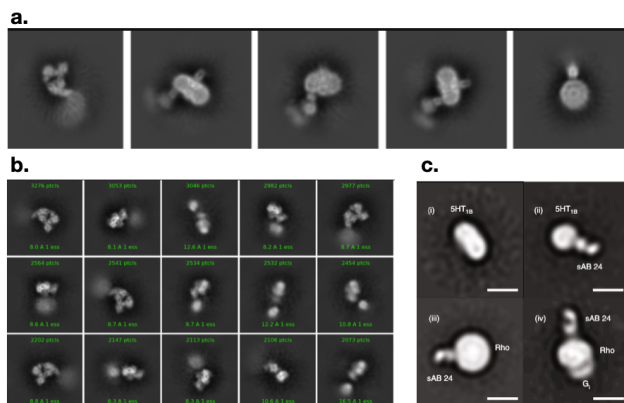


Figure 20. Première tentative d'imagerie du complexe TREK1-(BRIL)-TREK2/Fab(BRIL)

a. Moyennes 2D du complexe TREK1-(BRIL)-TREK2/Fab(BRIL). La classe la plus peuplée, à gauche, montre l'organisation du Fab mais surtout la flexibilité entre la région comprenant le Fab et le domaine BRIL vis à vis du canal ionique (le blob flou en bas...)

b. Si l'on sélectionne les particules centrées sur le Fab, on obtient des moyennes qui laissent imaginer qu'il serait possible d'obtenir sa structure...

c. Moyennes 2D, tirées de (Mukherjee *et al.*, 2020), montrant le même Fab en complexe avec une GPCR reconstituée en nanodisque. La rigidité entre le disque et le Fab est apparente.

Avant de contacter S. Mukherjee et T. Kossiakoff, nous avons déjà tenté une première fois d'utiliser des fragments d'anticorps dirigés contre BRIL. Par l'intermédiaire d'Eva, le laboratoire chinois de Kobilka nous avait envoyé un clone, sans autre précision, codant pour un Fab(BRIL). Une fois exprimé en cellules d'insectes sous forme sécrété, puis purifié à partir du milieu de culture par chromatographies d'affinité puis d'exclusion de taille, le Fab(BRIL) concentré fut utilisé pour des essais de co-élution avec TREK1-(BRIL)-TREK2, toujours sur une colonne d'exclusion de taille, mais n'a pas abouti à la formation d'un complexe. Cette piste a été abandonnée.

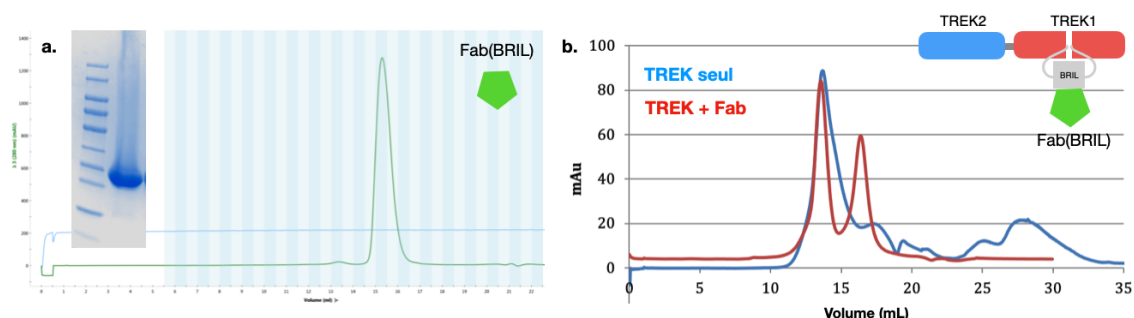


Figure 2. Précédente tentative de former un complexe TREK1-(BRIL)-TREK2/Fab(BRIL)

a. Purification d'un autre Fab(BRIL), gel SDS et profil SEC après purification.

b. Absence de formation de complexe lors d'une co-élution sur SEC. Le pic du profil rouge (mélange) n'est pas décalé vers les hauts poids moléculaires par rapport au pic du profil bleu (canal ionique seul).

Un canal homologue chez les plantes ne peut pas adopter un “domain-swap”

Toutes les structures des canaux K2P provenant d'animaux, sauf la première, présentent un “domain-swap” ou échange de domaines. L'hélice M1 d'une sous-unité, au lieu d'être accolée aux autres hélices de sa sous-unité, entre largement en contact avec la seconde sous-unité. Cet échange est permis par la grande protrusion extracellulaire présente entre M1 et M2, suffisamment longue pour permettre à M2 de passer au-dessus de la seconde sous-unité. L'échange de domaines est-il obligatoire ? Est-il un déterminant important de l'assemblage hétéromérique ? Pour répondre à ces questions, nous allons profiter des homologues végétaux (Hedrich, 2012), qui possèdent des capuchons extracellulaires beaucoup plus courts, rendant le swap physiquement impossible. C'est en observant des alignements de séquences que j'ai jeté mon dévolu sur le canal TPK4 de *A. Thaliana*, un canal sensible au Ca^{2+} , à la chaleur et au pH exprimé dans les tubes polliniques (Becker *et al.*, 2004). Des données préliminaires montrent que TPK4 peut être produit et purifié sous forme de dimère.

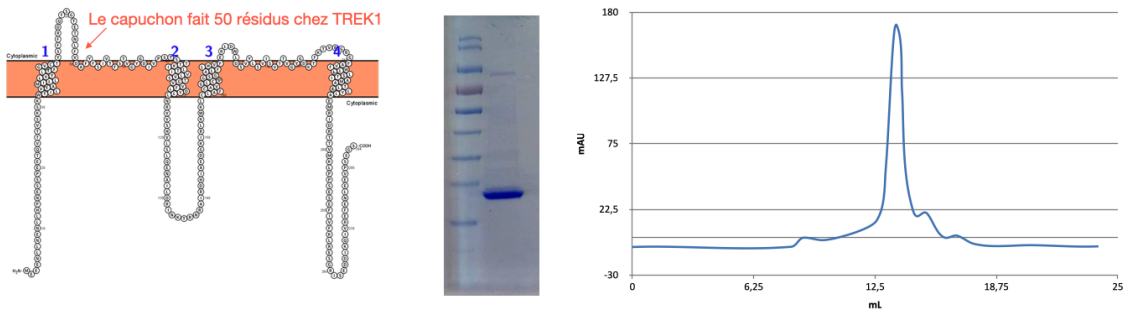


Figure 22. Topologie et purification du canal TPK4

À gauche, topologie du canal TPK4. Bien que la figure soit minuscule, on discerne bien le court capuchon extracellulaire placé après l'hélice M1, qui contraste avec les longs capuchons présents chez les membres humains de la famille.

À droite, TPK4, une fois tronqué en N-ter et C-ter à l'instar de ce qui se fait chez les homologues mammifères, s'exprime correctement (de l'ordre de 5 fois moins que TREK tout de même) et se purifie jusqu'à homogénéité, comme l'attestent le SDS-PAGE et le profil de chromatographie d'exclusion de taille.

Ce pas de côté, par rapport à notre objectif principal d'obtenir des structures d'hétéromères de la famille K2P, se justifie. En effet l'existence ou l'absence de l'échange de domaines détermine largement la surface d'interaction entre sous-unités (cette surface est de l'ordre de 5000 \AA^2 et 2000 \AA^2 dans les deux cas respectifs). Or c'est bien la surface d'interaction entre sous-unités qui va être responsable de la spécificité des assemblages homo ou hétéromériques. Si l'on souhaite comprendre pourquoi TREK1 est capable de s'associer avec TREK2 ou TRAAK mais pas avec TWIK1, alors il nous faut comprendre dans quel cas, et pourquoi, les deux sous-unités d'un canal adoptent un échange de domaines.

Bibliographie

- Angel, I. *et al.* (1993) 'Litoxetine: a selective 5-HT uptake inhibitor with concomitant 5-HT₃ receptor antagonist and antiemetic properties', *European journal of pharmacology*, 232(2), pp. 139–145.
- Baenziger, J. E. *et al.* (2015) 'Nicotinic acetylcholine receptor-lipid interactions: Mechanistic insight and biological function', *Biochimica et biophysica acta*, 1848(9), pp. 1806–1817.
- Baker, E. R. *et al.* (2004) 'Pharmacological Properties of $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptors Revealed by Heterologous Expression of Subunit Chimeras', *Molecular pharmacology*, 65(2), pp. 453–460.
- Barnes, N. M. *et al.* (2009) 'The 5-HT₃ receptor – the relationship between structure and function', *Neuropharmacology*, 56(1), pp. 273–284.
- Barnes, N. M. *et al.* (2021) 'International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CX. Classification of Receptors for 5-hydroxytryptamine; Pharmacology and Function', *Pharmacological reviews*, 73(1), pp. 310–520.
- Basak, S., Gicheru, Y., Rao, S., *et al.* (2018) 'Cryo-EM reveals two distinct serotonin-bound conformations of full-length 5-HT_{3A} receptor', *Nature*, 563(7730), pp. 270–274.
- Basak, S., Gicheru, Y., Samanta, A., *et al.* (2018) 'Cryo-EM structure of 5-HT_{3A} receptor in its resting conformation', *Nature communications*, 9(1), p. 514.
- Basak, S. *et al.* (2019) 'Molecular mechanism of setron-mediated inhibition of full-length 5-HT_{3A} receptor', *Nature communications*, 10(1), p. 3225.
- Basak, S. *et al.* (2020) 'High-resolution structures of multiple 5-HT_{3AR}-setron complexes reveal a novel mechanism of competitive inhibition', *eLife*, 9. doi: 10.7554/eLife.57870.
- Becker, D. *et al.* (2004) 'ATPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp. 15621–15626.
- Beckmann, J. and Lips, K. S. (2013) 'The non-neuronal cholinergic system in health and disease', *Pharmacology*, 92(5-6), pp. 286–302.
- Bellono, N. W. *et al.* (2017) 'Enterochromaffin Cells Are Gut Chemosensors that Couple to Sensory Neural Pathways', *Cell*, 170(1), pp. 185–198.e16.
- Bepler, T. *et al.* (2018) 'Positive-unlabeled convolutional neural networks for particle picking in cryo-electron micrographs', *Research in computational molecular biology: ... Annual International Conference, RECOMB ...: proceedings. International Conference on Research in Computational Molecular Biology*, 10812, pp. 245–247.
- Bhattacharya, A. *et al.* (2004) 'Uropathic observations in mice expressing a constitutively active point mutation in the 5-HT_{3A} receptor subunit', *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(24), pp. 5537–5548.
- Bieniossek, C. *et al.* (2012) 'MultiBac: expanding the research toolbox for multiprotein complexes', *Trends in biochemical sciences*, 37(2), pp. 49–57.
- Blin, S. *et al.* (2016) 'Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K_{2P} channels with unique properties', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(15), pp. 4200–4205.
- Bocquet, N. *et al.* (2006) 'A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family', *Nature*, 445(7123), pp. 116–119.
- Bocquet, N. *et al.* (2009) 'X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation', *Nature*, 457(7225), pp. 111–114.
- Boffi, J. C. *et al.* (2017) 'Differential Contribution of Subunit Interfaces to $\alpha 9\alpha 10$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Function', *Molecular pharmacology*, 91(3), pp. 250–262.
- Boyd, G. W. *et al.* (2003) 'Cell Surface Expression of 5-Hydroxytryptamine Type 3 Receptors Is Controlled by an Endoplasmic Reticulum Retention Signal', *The Journal of biological chemistry*, 278(30), pp. 27681–27687.
- Brejci, K. *et al.* (2001) 'Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors', *Nature*, 411(6835), pp. 269–276.
- Brohawn, S. G., Campbell, E. B. and Mackinnon, R. (2013) 'Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(6), pp. 2129–2134.
- Brohawn, S. G., del Marmol, J. and MacKinnon, R. (2012) 'Crystal Structure of the Human K_{2P} TRAAK, a Lipid-

- and Mechano-Sensitive K⁺ Ion Channel', *Science*, 335(6067), pp. 436–441.
- Cameron, L. P. *et al.* (2020) 'A non-hallucinogenic psychedelic analogue with therapeutic potential', *Nature*, pp. 1–6.
- Carobbio, S. *et al.* (2019) 'Brown and beige fat: From molecules to physiology and pathophysiology', *Biochimica et Biophysica Acta, Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864(1), pp. 37–50.
- Casida, J. E. (2018) 'Neonicotinoids and Other Insect Nicotinic Receptor Competitive Modulators: Progress and Prospects', *Annual review of entomology*, 63, pp. 125–144.
- Celie, P. H. N. *et al.* (2004) 'Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures', *Neuron*, 41(6), pp. 907–914.
- Changeux, J.-P. (2013) '50 years of allosteric interactions: the twists and turns of the models', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(12), pp. 819–829.
- Chun, E. *et al.* (2012) 'Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors', *Structure*, 20(6), pp. 967–976.
- Comes, N. *et al.* (2015) 'Involvement of potassium channels in the progression of cancer to a more malignant phenotype', *Biochimica et biophysica acta*, 1848(10 Pt B), pp. 2477–2492.
- Cosgrove, L. *et al.* (2016) 'Under the Influence: The Interplay among Industry, Publishing, and Drug Regulation', *Accountability in research*, 23(5), pp. 257–279.
- Croll, T. I. (2018) 'ISOLDE: a physically realistic environment for model building into low-resolution electron-density maps', *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(6), pp. 519–530.
- daCosta, C. J. B. *et al.* (2013) 'A distinct mechanism for activating uncoupled nicotinic acetylcholine receptors', *Nature chemical biology*, 9(11), pp. 701–707.
- daCosta, C. J. B. and Baenziger, J. E. (2009) 'A Lipid-dependent Uncoupled Conformation of the Acetylcholine Receptor', *The Journal of biological chemistry*, 284(26), pp. 17819–17825.
- daCosta, C. J. B. and Baenziger, J. E. (2013) 'Gating of pentameric ligand-gated ion channels: structural insights and ambiguities', *Structure*, 21(8), pp. 1271–1283.
- Dahout-Gonzalez, C. *et al.* (2006) 'Molecular, functional, and pathological aspects of the mitochondrial ADP/ATP carrier', *Physiology*, 21, pp. 242–249.
- Dang, H. *et al.* (2000) 'Probing the role of a conserved M1 proline residue in 5-hydroxytryptamine(3) receptor gating', *Molecular pharmacology*, 57(6), pp. 1114–1122.
- Davies, P. A. *et al.* (1999) 'The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function', *Nature*, 397(6717), pp. 359–363.
- Dong, C. *et al.* (2021) 'Psychedelic-inspired drug discovery using an engineered biosensor', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2021.03.043.
- Dong, Y. Y. *et al.* (2015) 'K_{2P} channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac', *Science*, 347(6227), pp. 1256–1259.
- Elegheert, J. *et al.* (2018) 'Lentiviral transduction of mammalian cells for fast, scalable and high-level production of soluble and membrane proteins', *Nature protocols*, 13(12), pp. 2991–3017.
- Elgoyhen, A. B., Katz, E. and Fuchs, P. A. (2009) 'The nicotinic receptor of cochlear hair cells: a possible pharmacotherapeutic target?', *Biochemical pharmacology*, 78(7), pp. 712–719.
- Emsley, P. *et al.* (2010) 'Features and development of Coot', *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 66(Pt 4), pp. 486–501.
- Feliciangeli, S. *et al.* (2015) 'The family of K_{2P} channels: salient structural and functional properties', *The Journal of physiology*. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2014.287268>.
- Filchakova, O. and McIntosh, J. M. (2013) 'Functional expression of human $\alpha 9^*$ nicotinic acetylcholine receptors in *X. laevis* oocytes is dependent on the $\alpha 9$ subunit 5' UTR', *PLoS one*, 8(5), p. e64655.
- Frank, J. (2006) *Three-Dimensional Electron Microscopy of Macromolecular Assemblies: Visualization of Biological Molecules in Their Native State*. Oxford University Press.
- Franks, N. P. (2008) 'General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal', *Nature reviews. Neuroscience*, 9(5), pp. 370–386.
- Fung, T. C. *et al.* (2019) 'Intestinal serotonin and fluoxetine exposure modulate bacterial colonization in the gut', *Nature microbiology*, 4(12), pp. 2064–2073.

- Gielen, M. and Corringer, P.-J. (2018) 'The dual-gate model for pentameric ligand-gated ion channels activation and desensitization', *The Journal of physiology*, 596(10), pp. 1873–1902.
- Glaeser, R. M. and Han, B.-G. (2017) 'Opinion: hazards faced by macromolecules when confined to thin aqueous films', *Biophysics reports*, 3(1), pp. 1–7.
- Gong, S. *et al.* (2019) 'Intestinal Microbiota Mediates the Susceptibility to Polymicrobial Sepsis-Induced Liver Injury by Granisetron Generation in Mice', *Hepatology*, 69(4), pp. 1751–1767.
- Gotti, C. and Clementi, F. (2004) 'Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology', *Progress in neurobiology*, 74(6), pp. 363–396.
- Gu, S. *et al.* (2020) 'Hair cell $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor functional expression regulated by ligand binding and deafness gene products', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), pp. 24534–24544.
- Hallmann, C. A. *et al.* (2017) 'More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas', *PloS one*, 12(10), p. e0185809.
- Hansen, S. B. *et al.* (2005) 'Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations', *The EMBO journal*, 24(20), pp. 3635–3646.
- Hassaine, G. *et al.* (2013) 'Large scale expression and purification of the mouse 5-HT3 receptor', *Biochimica et biophysica acta*, 1828(11), pp. 2544–2552.
- Hassaine, G. *et al.* (2014) 'X-ray structure of the mouse serotonin 5-HT3 receptor', *Nature*, 512(7514), pp. 276–281.
- Hassaine, G. *et al.* (2017) 'Expression, Biochemistry, and Stabilization with Camel Antibodies of Membrane Proteins: Case Study of the Mouse 5-HT3 Receptor', *Methods in molecular biology*, 1635, pp. 139–168.
- Hecker, A. *et al.* (2015) 'Phosphocholine-Modified Macromolecules and Canonical Nicotinic Agonists Inhibit ATP-Induced IL-1 β Release', *Journal of immunology*, 195(5), pp. 2325–2334.
- Hedrich, R. (2012) 'Ion Channels in Plants', *Physiological reviews*, 92(4), pp. 1777–1811.
- Hénault, C. M. *et al.* (2019) 'A lipid site shapes the agonist response of a pentameric ligand-gated ion channel', *Nature chemical biology*, 15(12), pp. 1156–1164.
- Hilf, R. J. C. and Dutzler, R. (2008) 'X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel', *Nature*, 452(7185), pp. 375–379.
- Hwang, E. M. *et al.* (2014) 'A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes', *Nature communications*, 5, p. 3227.
- Ihara, M. *et al.* (2020) 'Cofactor-enabled functional expression of fruit fly, honeybee, and bumblebee nicotinic receptors reveals picomolar neonicotinoid actions', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(28), pp. 16283–16291.
- Imada, T. *et al.* (2017) 'Serotonin hormonally regulates lacrimal gland secretory function via the serotonin type 3a receptor', *Scientific reports*, 7(1), p. 6965.
- Indurthi, D. C. *et al.* (2014) 'Presence of multiple binding sites on $\alpha 9\alpha 10$ nAChR receptors alludes to stoichiometric-dependent action of the α -conotoxin, Vc1.1', *Biochemical pharmacology*, 89(1), pp. 131–140.
- Isacoff, E. Y. *et al.* (2013) 'Conduits of Life's Spark: A Perspective on Ion Channel Research since the Birth of Neuron', *Neuron*, 80(3), pp. 658–674.
- Jansen, M., Bali, M. and Akabas, M. H. (2008) 'Modular Design of Cys-loop Ligand-gated Ion Channels: Functional 5-HT3 and GABA 1 Receptors Lacking the Large Cytoplasmic M3M4 Loop', *The Journal of general physiology*, 131(2), pp. 137–146.
- Jeschke, P. (2021) 'Status and outlook for acaricide and insecticide discovery', *Pest management science*, 77(1), pp. 64–76.
- Kabbani, N. and Nichols, R. A. (2018) 'Beyond the Channel: Metabotropic Signaling by Nicotinic Receptors', *Trends in pharmacological sciences*, 39(4), pp. 354–366.
- Kelley, S. P. *et al.* (2003) 'A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT3 receptors', *Nature*, 424(6946), pp. 321–324.
- Kim, J. J. *et al.* (2020) 'Shared structural mechanisms of general anaesthetics and benzodiazepines', *Nature*. doi: 10.1038/s41586-020-2654-5.
- Kim, K. *et al.* (2020) 'Structure of a Hallucinogen-Activated Gq-Coupled 5-HT2A Serotonin Receptor', *Cell*, 182(6), pp. 1574–1588.e19.

- Koyama, Y., Kondo, M. and Shimada, S. (2017) 'Building a 5-HT3A Receptor Expression Map in the Mouse Brain', *Scientific reports*, 7, p. 42884.
- Krzywkowski, K. *et al.* (2008) 'High-frequency HTR3B variant associated with major depression dramatically augments the signaling of the human 5-HT3AB receptor', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(2), pp. 722–727.
- Kumar, A. *et al.* (2020) 'Mechanisms of activation and desensitization of full-length glycine receptor in lipid nanodiscs', *Nature communications*, 11(1), p. 3752.
- Ladefoged, L. K. *et al.* (2018) 'Modeling and Mutational Analysis of the Binding Mode for the Multimodal Antidepressant Drug Vortioxetine to the Human 5-HT3A Receptor', *Molecular pharmacology*, 94(6), pp. 1421–1434.
- Lengyel, M., Czirják, G. and Enyedi, P. (2016) 'Formation of Functional Heterodimers by TREK-1 and TREK-2 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits', *The Journal of biological chemistry*, 291(26), pp. 13649–13661.
- Levitz, J. *et al.* (2016) 'Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(15), pp. 4194–4199.
- Li, B., Rietmeijer, R. A. and Brohawn, S. G. (2020) 'Structural basis for pH gating of the two-pore domain K⁺ channel TASK2', *Nature*, 586(7829), pp. 457–462.
- Lochner, M. and Lummis, S. C. R. (2010) 'Agonists and antagonists bind to an A-A interface in the heteromeric 5-HT3AB receptor', *Biophysical journal*, 98(8), pp. 1494–1502.
- Lolicato, M. *et al.* (2017) 'K2P2.1 (TREK-1)-activator complexes reveal a cryptic selectivity filter binding site', *Nature*, 547(7663), pp. 364–368.
- Masiulis, S. *et al.* (2019) 'GABAA receptor signalling mechanisms revealed by structural pharmacology', *Nature*, 565(7740), pp. 454–459.
- McClenaghan, C. *et al.* (2016) 'Polymodal activation of the TREK-2 K2P channel produces structurally distinct open states', *The Journal of general physiology*, 147(6), pp. 497–505.
- McIntosh, J. M. *et al.* (2009) 'Alpha9 nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain', *Biochemical pharmacology*, 78(7), pp. 693–702.
- Miller, A. N. and Long, S. B. (2012) 'Crystal Structure of the Human Two-Pore Domain Potassium Channel K2P1', *Science*, 335(6067), pp. 432–436.
- Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. and Unwin, N. (2003) 'Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore', *Nature*, 423(6943), pp. 949–955.
- Monod, J., Wyman, J. and Changeux, J. P. (1965) 'ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL', *Journal of molecular biology*, 12, pp. 88–118.
- Mørk, A. *et al.* (2012) 'Pharmacological effects of Lu AA21004: a novel multimodal compound for the treatment of major depressive disorder', *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 340(3), pp. 666–675.
- Mukherjee, S. *et al.* (2020) 'Synthetic antibodies against BRIL as universal fiducial marks for single-particle cryoEM structure determination of membrane proteins', *Nature communications*, 11(1), p. 1598.
- Naydenova, K. and Russo, C. J. (2017) 'Measuring the effects of particle orientation to improve the efficiency of electron cryomicroscopy', *Nature communications*, 8(1), p. 629.
- Nemecz, À. *et al.* (2016) 'Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels', *Neuron*, 90(3), pp. 452–470.
- Niesler, B. *et al.* (2007) 'Characterization of the novel human serotonin receptor subunits 5-HT3C, 5-HT3D, and 5-HT3E', *Molecular pharmacology*, 72(1), pp. 8–17.
- Niesler, B. (2011) '5-HT3 receptors: potential of individual isoforms for personalised therapy', *Current opinion in pharmacology*, 11(1), pp. 81–86.
- Noviello, C. M. *et al.* (2021) 'Structure and gating mechanism of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.049.
- Nury, H. *et al.* (2005) 'Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers', *FEBS letters*, 579(27), pp. 6031–6036.
- Nury, H. *et al.* (2006) 'Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier', *Annual review of biochemistry*, 75, pp. 713–741.
- Nury, H. *et al.* (2008) 'Mitochondrial bovine ADP/ATP carrier in detergent is predominantly monomeric but also

- forms multimeric species', *Biochemistry*, 47(47), pp. 12319–12331.
- Nury, H., Bocquet, N., *et al.* (2010) 'Crystal structure of the extracellular domain of a bacterial ligand-gated ion channel', *Journal of molecular biology*, 395(5), pp. 1114–1127.
- Nury, H., Poitevin, F., *et al.* (2010) 'One-microsecond molecular dynamics simulation of channel gating in a nicotinic receptor homologue', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(14), pp. 6275–6280.
- Nury, H. *et al.* (2011) 'X-ray structures of general anaesthetics bound to a pentameric ligand-gated ion channel', *Nature*, 469(7330), pp. 428–431.
- Ohara-Imaizumi, M. *et al.* (2013) 'Serotonin regulates glucose-stimulated insulin secretion from pancreatic β cells during pregnancy', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(48), pp. 19420–19425.
- Oh, C.-M. *et al.* (2015) 'Regulation of systemic energy homeostasis by serotonin in adipose tissues', *Nature communications*, 6, p. 6794.
- Pebay-Peyroula, E. *et al.* (2003) 'Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside', *Nature*, 426(6962), pp. 39–44.
- Polovinkin, L. *et al.* (2018) 'Conformational transitions of the serotonin 5-HT₃ receptor', *Nature*, 563(7730), pp. 275–279.
- Prevost, M. S. *et al.* (2012) 'A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel', *Nature structural & molecular biology*, 19(6), pp. 642–649.
- Punjani, A. and Fleet, D. J. (2021) '3D Flexible Refinement: Structure and Motion of Flexible Proteins from Cryo-EM', *bioRxiv*. doi: 10.1101/2021.04.22.440893.
- Punjani, A., Zhang, H. and Fleet, D. J. (2020) 'Non-uniform refinement: adaptive regularization improves single-particle cryo-EM reconstruction', *Nature methods*, 17(12), pp. 1214–1221.
- Rahman, M. M. *et al.* (2020) 'Structure of the Native Muscle-type Nicotinic Receptor and Inhibition by Snake Venom Toxins', *Neuron*, 0(0). doi: 10.1016/j.neuron.2020.03.012.
- Ramírez-Aportela, E. *et al.* (2020) 'Automatic local resolution-based sharpening of cryo-EM maps', *Bioinformatics*, 36(3), pp. 765–772.
- Richter, K. *et al.* (2016) 'Phosphocholine - an agonist of metabotropic but not of ionotropic functions of α 9-containing nicotinic acetylcholine receptors', *Scientific reports*, 6(1), p. 28660.
- Riga, M. S. *et al.* (2016) 'Involvement of 5-HT₃ receptors in the action of vortioxetine in rat brain: Focus on glutamatergic and GABAergic neurotransmission', *Neuropharmacology*, pp. 73–81. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.04.023.
- Ritter, K. E. *et al.* (2017) 'Serotonin Receptor 5-HT_{3A} Affects Development of Bladder Innervation and Urinary Bladder Function', *Frontiers in neuroscience*, 11, p. 690.
- Rödström, K. E. J. *et al.* (2020) 'A lower X-gate in TASK channels traps inhibitors within the vestibule', *Nature*, 582(7812), pp. 443–447.
- Romero, H. K. *et al.* (2017) 'Inhibition of α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptors prevents chemotherapy-induced neuropathic pain', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(10), pp. E1825–E1832.
- Royal, Perrine *et al.* (2018) 'Migraine-Associated TRESK Mutations Increase Neuronal Excitability through Alternative Translation Initiation and Inhibition of TREK', *Neuron*. doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.039.
- Rufener, L. *et al.* (2020) 'Nicotinic acetylcholine receptors: Ex-vivo expression of functional, non-hybrid, heteropentameric receptors from a marine arthropod, *Lepeophtheirus salmonis*', *PLoS pathogens*, 16(7), p. e1008715.
- Ruprecht, J. J. *et al.* (2019) 'The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier', *Cell*. doi: 10.1016/j.cell.2018.11.025.
- Russo, P. *et al.* (2014) 'Cholinergic receptors as target for cancer therapy in a systems medicine perspective', *Current molecular medicine*, 14(9), pp. 1126–1138.
- Sanchez, C., Asin, K. E. and Artigas, F. (2015) 'Vortioxetine, a novel antidepressant with multimodal activity: review of preclinical and clinical data', *Pharmacology & therapeutics*, 145, pp. 43–57.
- Sanchez-Garcia, R. *et al.* (2020) 'DeepEMhancer: a deep learning solution for cryo-EM volume post-processing', *bioRxiv*. doi: 10.1101/2020.06.12.148296.
- Sanger, G. J. and Andrews, P. L. R. (2018) 'A History of Drug Discovery for Treatment of Nausea and Vomiting

and the Implications for Future Research', *Frontiers in pharmacology*, 9, p. 913.

Sauguet, L. *et al.* (2013) 'Crystal structures of a pentameric ligand-gated ion channel provide a mechanism for activation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=24367074&retmode=ref&cmd=prlinks>.

Scheres, S. H. W. (2012) 'RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination', *Journal of structural biology*, 180(3), pp. 519–530.

Senoo, N. *et al.* (2020) 'Cardiolipin, conformation, and respiratory complex-dependent oligomerization of the major mitochondrial ADP/ATP carrier in yeast', *Science advances*, 6(35), p. eabb0780.

Spurny, R. *et al.* (2012) 'Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(44), pp. E3028–34.

Tasneem, A. *et al.* (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), p. R4.

Terwilliger, T. C. *et al.* (2020) 'Improvement of cryo-EM maps by density modification', *Nature methods*, 17(9), pp. 923–927.

Thompson, A. J. (2013) 'Recent developments in 5-HT₃ receptor pharmacology', *Structure*, 34(2), pp. 100–109.

Thompson, A. J., Lester, H. A. and Lummis, S. C. R. (2010) 'The structural basis of function in Cys-loop receptors', *Quarterly reviews of biophysics*, 43(04), pp. 449–499.

Thompson, A. J. and Lummis, S. C. R. (2013) 'A single channel mutation alters agonist efficacy at 5-HT_{3A} and 5-HT_{3AB} receptors', *British journal of pharmacology*, 170(2), pp. 391–402.

Thompson, A. J., Price, K. L. and Lummis, S. C. R. (2011) 'Cysteine modification reveals which subunits form the ligand binding site in human heteromeric 5-HT_{3AB} receptors', *The Journal of physiology*, 589(Pt 17), pp. 4243–4257.

Thompson, M. J., Domville, J. A. and Baenziger, J. E. (2020) 'The functional role of the α 4 transmembrane helix in the muscle nicotinic acetylcholine receptor probed through mutagenesis and coevolutionary analyses', *The Journal of biological chemistry*, 295(32), pp. 11056–11067.

Tomizawa, M., Latli, B. and Casida, J. E. (1996) 'Novel neonicotinoid-agarose affinity column for *Drosophila* and *Musca* nicotinic acetylcholine receptors', *Journal of neurochemistry*, 67(4), pp. 1669–1676.

Unwin, N. (2005) 'Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4Å resolution', *Journal of molecular biology*, 346(4), pp. 967–989.

Unwin, N. (2013) 'Nicotinic acetylcholine receptor and the structural basis of neuromuscular transmission: insights from Torpedo postsynaptic membranes', *Quarterly reviews of biophysics*, pp. 1–40.

Verbitsky, M. *et al.* (2000) 'Mixed nicotinic–muscarinic properties of the α 9 nicotinic cholinergic receptor', *Neuropharmacology*, 39(13), pp. 2515–2524.

Vincler, M. *et al.* (2006) 'Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptors', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), pp. 17880–17884.

Wagner, T. *et al.* (2019) 'SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM', *Communications biology*, 2, p. 218.

Walstab, J., Rappold, G. and Niesler, B. (2010) '5-HT₃ receptors: role in disease and target of drugs', *Pharmacology & therapeutics*, 128(1), pp. 146–169.

Weber, S. *et al.* (2009) 'Treatment with the 5-HT₃ antagonist tropisetron modulates glucose-induced obesity in mice', *International journal of obesity*, 33(12), pp. 1339–1347.

Weissmann, F. *et al.* (2016) 'biGBac enables rapid gene assembly for the expression of large multisubunit protein complexes', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(19), pp. E2564–9.

Weng, Y. *et al.* (2010) 'Anesthetic sensitivity of the *Gloeobacter violaceus* proton-gated ion channel', *Anesthesia and analgesia*, 110(1), pp. 59–63.

Wood, T. J. and Goulson, D. (2017) 'The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013', *Environmental science and pollution research international*, 24(21), pp. 17285–17325.

Wu, Z.-S. *et al.* (2015) 'Ion channels gated by acetylcholine and serotonin: structures, biology, and drug discovery', *Acta pharmacologica Sinica*, 36(8), pp. 895–907.

Yano, J. M. *et al.* (2015) 'Indigenous Bacteria from the Gut Microbiota Regulate Host Serotonin Biosynthesis',

Cell, 161(2), pp. 264–276.

Yu, J. *et al.* (2021) 'Mechanism of gating and partial agonist action in the glycine receptor', *Cell*, 184(4), pp. 957–968.e21.

Zakrzewicz, A. *et al.* (2017) 'Canonical and Novel Non-Canonical Cholinergic Agonists Inhibit ATP-Induced Release of Monocytic Interleukin-1 β via Different Combinations of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits α 7, α 9 and α 10', *Frontiers in cellular neuroscience*, 11, p. 189.

Zarkadas, E. *et al.* (2020) 'The Binding of Palonosetron and Other Antiemetic Drugs to the Serotonin 5-HT₃ Receptor', *Structure*, 28(10), pp. 1131–1140.e4.

Zhang, Y. *et al.* (2021) 'Asymmetric opening of the homopentameric 5-HT_{3A} serotonin receptor in lipid bilayers', *Nature communications*, 12(1), pp. 1–15.

Zivanov, J. *et al.* (2018) 'New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3', *eLife*, 7. doi: 10.7554/eLife.42166.

Zouridakis, M. *et al.* (2019) 'Crystal structure of the monomeric extracellular domain of α 9 nicotinic receptor subunit in complex with α -conotoxin RglA: Molecular dynamics insights into RglA binding to α 9 α 10 nicotinic receptors', *Frontiers in pharmacology*, 10, p. 474.