



HAL
open science

Architecture moléculaire des récepteurs NMDA : Arrangement tétramérique et interfaces entre sous-unités

Morgane Riou

► **To cite this version:**

Morgane Riou. Architecture moléculaire des récepteurs NMDA : Arrangement tétramérique et interfaces entre sous-unités. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066081 . tel-01020863

HAL Id: tel-01020863

<https://theses.hal.science/tel-01020863>

Submitted on 8 Jul 2014

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

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

THESE DE DOCTORAT

De l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI
Ecole Doctorale Cerveau Cognition Comportement

<p>ARCHITECTURE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS NMDA : ARRANGEMENT TETRAMERIQUE ET INTERFACES ENTRE SOUS-UNITES</p>

Présentée par : Morgane RIOU

Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS)
CNRS UMR8197, INSERM U1024
Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris

Direction Générale de l'Armement

Soutenue le 28 février 2014 devant le jury composé de :

Pr. Germain TRUGNAN	Président
Dr. David PERRAIS	Rapporteur
Dr. Pierre CHARNET	Rapporteur
Dr. Antoine TALY	Examineur
Dr. Pierre PAOLETTI	Directeur de Thèse

Table des Matières

Table des Figures	7
Résumé	11
Remerciements	13
A propos	15
PREMIERE PARTIE : INTRODUCTION	17
1. INTRODUCTION SUR LES RECEPTEURS-CANAUX	19
1.1. Bref historique de la recherche sur les canaux ioniques	19
1.2. Aperçu général des canaux ioniques activés par les ligands	24
1.3. Les récepteurs-canaux trimériques	27
1.4. Les récepteurs-canaux tétramériques	29
1.5. Les récepteurs-canaux pentamériques	30
2. RECEPTEURS DU GLUTAMATE	35
2.1. Récepteurs métabotropiques du glutamate	37
2.2. Récepteurs-canaux (ou ionotropiques) du glutamate	39
2.2.1. Propriétés générales des récepteurs-canaux du glutamate.....	39
2.2.2. Récepteurs AMPA.....	44
2.2.3. Récepteurs kainate.....	47
2.2.4. Récepteurs delta.....	50
2.2.5. Récepteurs NMDA.....	52
2.2.5.1. <i>Diversité moléculaire et distribution des sous-unités</i>	52

2.2.5.2. <i>Propriétés biophysiques</i>	57
2.2.5.3. <i>Modulations allostériques</i>	63
2.2.5.4. <i>Rôle des NTDs dans la régulation de l'activité des récepteurs NMDA</i> ...	72
2.2.5.5. <i>Physio-pathologie des récepteurs NMDA</i>	77
2.2.6. Architecture moléculaire et organisation modulaire des récepteurs-canaux du glutamate.....	81
2.2.6.1. <i>Topologie membranaire et organisation modulaire</i>	81
2.2.6.2. <i>Arrangement tétramérique des iGluRs</i>	97
2.2.7. Mécanismes structuraux d'activation.....	104
2.2.8. Mécanismes structuraux de désensibilisation.....	108
3. BIOGENESE ET ARRANGEMENT DES RECEPTEURS-CANAU DU GLUTAMATE	114
3.1. Assemblage des récepteurs-canaux	115
3.2. L'assemblage et l'arrangement des sous-unités au sein d'un récepteur AMPA tétramérique se fait en plusieurs étapes	117
3.3. Cas particulier des récepteurs NMDA hétérotétramériques	124
4. UNE NOUVELLE APPROCHE : UTILISATION D'ACIDES-AMINES NON-NATURELS POUR L'ETUDE DES RECEPTEURS-CANAU	127
4.1. L'incorporation d'UAAs génétiquement encodés : une technologie innovante basée sur l'expansion du code génétique	127
4.1.1. Rappel historique sur la méthodologie des UAAs.....	128
4.1.2. Concept d'expansion du code génétique.....	131
4.2. Applications biologiques de l'expansion du code génétique	134
4.2.1. Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand.....	135
4.2.2. Détection de changements conformationnels.....	138
4.2.3. Contrôle de l'état d'activation d'une protéine avec des UAAs photo-cagés...	144
4.2.4. Etude des modifications post-traductionnelles.....	145
4.3. Utilisation des UAAs dans l'étude des récepteurs membranaires	146
4.3.1. Applications aux récepteurs couplés aux protéines G.....	146
4.3.2. Applications aux récepteurs-canaux.....	147
4.4. Expansion du code génétique: perspectives et applications <i>in vivo</i>	148

DEUXIEME PARTIE RESULTATS	151
1. ARRANGEMENT DES SOUS-UNITES AU SEIN D'UN RECEPTEUR NMDA TETRAMERIQUE	153
1.1. Contexte de l'étude	153
1.1.1. Arrangement multimérique des récepteurs-canaux.....	153
1.1.2. Arrangement des sous-unités dans un récepteur AMPA.....	155
1.1.3. Le cas des récepteurs NMDA : un arrangement débattu.....	157
1.1.4. Approche adoptée dans cette étude.....	162
1.2. Article 1	163
1.3. Discussion	173
1.3.1. Principaux résultats.....	173
1.3.2. Quid des autres sous-types de récepteurs NMDA ?.....	180
1.3.2. L'arrangement des récepteurs GluN1/GluN2 : la controverse relancée.....	182
1.3.3. Perspectives.....	189
1.3.4. Asymétrie structurale et fonctionnelle des sous-unités dans un récepteur-canal du glutamate.....	190
2. INCORPORATION D'ACIDES-AMINES NON-NATURELS DANS LES RECEPTEURS NMDA : IMPLEMENTATION ET APPLICATION POUR L'ETUDE DES INTERFACES ENTRE SOUS-UNITES ET DE LEUR DYNAMIQUE	195
2.1. Incorporation d'acides-aminés non-naturels génétiquement encodés dans les récepteurs NMDA exprimés en ovocytes de <i>Xénope</i>	195
2.1.1. Contexte de l'étude.....	195
2.1.2. Article 2.....	199
2.1.3. Discussion.....	207
2.2. Création d'un récepteur NMDA contrôlé par la lumière par incorporation d'acides-aminés photo-réactifs : application à l'étude des interfaces entre domaines N-terminaux	211

2.2.1. Contexte de l'étude.....	211
2.2.2. Article 3.....	213
2.2.3. Supplément d'informations.....	221
2.2.4. Discussion.....	235
2.2.4.1. <i>Conclusions de l'étude et perspectives</i>	235
2.2.4.2. <i>L'expansion du code génétique, une nouvelle méthode pour obtenir des récepteurs-canaux sensibles à la lumière</i>	240
2.3. Photo-pontage "état-dépendant" de récepteurs NMDA-GluN1/GluN2A.....	249
2.3.1. Contexte de l'étude.....	249
2.3.2. Méthodes.....	254
2.3.3. Résultats.....	257
2.3.3.1. <i>Modélisation par homologie d'un dimère d'ABDs GluN1/GluN2A dans une conformation "type désensibilisé"</i>	257
2.3.3.2. <i>Incorporation d'acides-aminés non-naturels photo-réactifs dans la région identifiée comme interface potentielle entre lobes inférieurs des ABDs...</i>	258
2.3.3.3. <i>Caractérisation de la photo-inactivation du récepteur GluN1wt/GluN2AN697Azf</i>	261
2.3.3.4. <i>Propriétés fonctionnelles du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivé</i>	265
2.3.3.5. <i>Pontage inter-sous-unités du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivé</i>	269
2.3.3.6. <i>Le récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF est aussi photo-inactivé dans des conditions de pH acide</i>	272
2.3.4. Discussion.....	274
2.3.4.1. <i>Conclusions de l'étude</i>	274
2.3.4.2. <i>Perspectives de l'étude</i>	277
Conclusion générale.....	279
Liste des abréviations.....	283
Références.....	285

Table des Figures

I- INTRODUCTION

Figure 1.1.	Les canaux ioniques, des protéines membranaires.....	20
Figure 1.2.	Enregistrement de courant unique en patch-clamp.....	21
Figure 1.3.	Structure de plusieurs récepteurs membranaires.....	23
Figure 1.4.	Rôles des récepteurs-canaux dans la transmission neuronale.....	25
Figure 1.5.	Topologie membranaire et stoechiométrie des récepteurs-canaux.....	26
Figure 1.6.	Mécanisme d'activation proposé pour le récepteur-canal P2X.....	28
Figure 1.7.	Arbre phylogénétique des récepteurs pentamériques.....	30
Figure 1.8.	Structure des récepteurs-canaux pentamériques.....	32
Figure 1.9.	Mécanisme d'activation proposé pour les récepteurs-canaux pentamériques....	33
Figure 2.1.	Représentation schématique d'une synapse glutamatergique.....	36
Figure 2.2.	Topologie membranaire d'un récepteur métabotrope du glutamate.....	38
Figure 2.3.	Arbre phylogénétique des sous-unités de récepteurs-canaux du glutamate.....	40
Figure 2.4.	Propriétés cinétiques des récepteurs-canaux du glutamate (iGluRs).....	41
Figure 2.5.	Interactions des récepteurs AMPA avec les protéines CNIH et TARPs.....	46
Figure 2.6.	Propriétés biophysiques des récepteurs kainate.....	49
Figure 2.7.	Diversité des sous-unités des récepteurs NMDA, structure et localisation.....	53
Figure 2.8.	Distribution spatiale et temporelle des sous-unités des récepteurs NMDA	55
Figure 2.9.	Propriétés biophysiques des différents sous-types de récepteurs NDMA.....	58
Figure 2.10	Propriétés de perméation des différents sous-types de récepteurs NMDA.....	61
Figure 2.11	Probabilité d'ouverture du canal ionique des récepteurs NMDA	62
Figure 2.12.	Sites de modulation des récepteurs NMDA.....	63

Figure 2.13. Distribution du zinc "libre" dans le cerveau.....	65
Figure 2.14. Sensibilité au zinc des différents sous-types de récepteurs NMDA.....	66
Figure 2.15. Modèle de modulation des récepteurs GluN1/GluN2A par le zinc	67
Figure 2.16. Modulation allostérique positive des récepteurs NMDA par la spermine.....	69
Figure 2.17. Modulation allostérique négative des récepteurs NMDA par l'ifenprodil.....	71
Figure 2.18. Sites de liaison du zinc et de l'ifenprodil sur les domaines N-terminaux (NTDs) des récepteurs GluN1/GluN2B.....	73
Figure 2.19. Régulation bifonctionnelle de l'activité des récepteurs NDMA	76
Figure 2.20. Mécanismes d'action des anticorps dans les encéphalites anti-NMDA.....	79
Figure 2.21. Topologie membranaire et organisation modulaire des sous-unités iGluRs.....	82
Figure 2.22. Structure des domaines de liaison des agonistes (ABDs) d'iGluRs.....	84
Figure 2.23. Assemblage dimérique des ABDs de récepteurs AMPA et NMDA.....	86
Figure 2.24. Conservation de séquences parmi les sous-unités de récepteurs NDMA.....	87
Figure 2.25. Structure des NTDs des sous-unités d'iGluRs.....	88
Figure 2.26. Conformation twistée des NTDs des sous-unités de récepteurs NMDA.....	89
Figure 2.27. Assemblage dimérique des NTDs d'iGluRs.....	90
Figure 2.28. Interfaces de dimérisation des NTDs de récepteurs AMPA et NMDA.....	92
Figure 2.29. Arrangement du canal ionique dans un iGluR.....	95
Figure 2.30. Structure et arrangement du récepteur AMPA-GluA2 homotétramérique.....	97
Figure 2.31. Interfaces intra- et inter-sous-unités dans le récepteur AMPA-GluA2.....	99
Figure 2.32. Asymétrie du récepteur AMPA-GluA2 homotétramérique.....	101
Figure 2.33. Structure des tétramères de NTDs d'iGluRs.....	103
Figure 2.34. Modèle d'activation et de désensibilisation d'un récepteur AMPA.....	105
Figure 2.35. Etude de la désensibilisation des récepteurs AMPA.....	109
Figure 2.36. Modulation des récepteurs kainate par des ions Cl^- , Na^+ , Zn^{2+}	111
Figure 3.1. Biogenèse des récepteurs membranaires de type iGluR-AMPA	115
Figure 3.2. Affinités d'association entre NTDs de sous-unités AMPA	120
Figure 3.3. Mécanisme proposé pour l'assemblage des récepteurs AMPA.....	122
Figure 3.4. Hypothèses sur l'assemblage des iGluRs hétérotétramériques.....	123

Figure 3.5. Mécanisme proposé pour l'assemblage des récepteurs NMDA	126
Figure 4.1. Incorporation d'acides-aminés non-naturels (UAAs) dans une protéine : approche semi-synthétique.....	128
Figure 4.2. Structure chimique des différents UAAs encodés génétiquement	130
Figure 4.3. Incorporation d'UAA dans une protéine : approche génétique.....	132
Figure 4.4. Incorporation de dérivés de la tyrosine par expansion du code génétique.....	133
Figure 4.5. L'AzF : une sonde chimique pour l'étude des protéines.....	135
Figure 4.6. Photo-pontage entre SecA et SecY par l'intermédiaire du Bpa photo-réactif...	136
Figure 4.7. Cristallisation d'une liaison covalente impliquant un Bpa photo-réactif.....	138
Figure 4.8. Etude du canal potassique Shaker grâce à l'UAA fluorescent Anap.....	141
Figure 4.9. Réactions de conjugaison entre un fluorophore et un UAA.....	143
Figure 4.10. Interaction cation- π entre un tryptophane et l'acétylcholine.....	147

II- RESULTATS

Figure 1.1. Assemblages multimériques des récepteurs-canaux.....	154
Figure 1.2. Structure cristallographique du récepteur AMPA-GluA2 homotétramérique...	156
Figure 1.3. Hypothèses sur l'arrangement des sous-unités d'un récepteur GluN1/GluN2..	158
Figure 1.4. Trois arrangements possibles des ABDs dans le récepteur NMDA hétérotétramérique.....	161
Figure 1.5. Arrangement alterné des sous-unités GluN1 et GluN2A autour du pore.....	173
Figure 1.6. Formation d'un hétérodimère par pontage disulfure.....	175
Figure 1.7. Structure cristallographique d'un homodimère de NTDs de GluN1.....	179
Figure 1.8. Arrangement alterné des sous-unités dans les récepteurs GluN1/GluN2B-D...	181
Figure 1.9. Des données AFM en faveur d'un arrangement non alterné des sous-unités....	184
Figure 1.10. Affinités pour les agonistes des récepteurs NMDA pontés <i>via</i> GluN1-E698C....	188
Figure 1.11. Disposition relative des "linkers" ABD-TMD autour du pore.....	191

Figure 1.12.	Les récepteurs kainate s'assemblent aussi en dimères de dimères.....	194
Figure 2.1.	Orthogonalité de la paire ARNt-suppresseur/BpaRS.....	207
Figure 2.2.	Structure chimique d'UAAs fluorescents	210
Figure 2.2.1.	Position du résidu GluN1-Y109 dans le dimère de NTDs GluN1/GluN2B.	236
Figure 2.2.2.	Structure d'un tétramère de NTDs GluN1/GluN2B.....	237
Figure 2.2.3.	Approches d'optogénétique pour l'étude des récepteurs-canaux.....	240
Figure 2.2.4.	Utilisation de « ligands attachés » photo-isomérisables pour l'étude des récepteurs-canaux.....	242
Figure 2.2.5.	Contrôle de l'excitabilité neuronale par un récepteur kainate photo-sensible..	244
Figure 2.2.6.	Photo-isomérisation de l'UAA fluorescent AzoPhe.....	246
Figure 2.2.7.	Création de canaux potassiques sensibles à la lumière (PIRK).....	248
Figure 2.3.1.	Liaison du zinc dans les récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B.....	250
Figure 2.3.2.	Modèle de l'inhibition des récepteurs GluN1/GluN2A par le zinc.....	251
Figure 2.3.3.	Réarrangements des ABDs durant la désensibilisation des récepteurs AMPA..	253
Figure 2.3.4.	Modèle d'un hétérodimère d'ABDs GluN1/GluN2A dans l'état "type désensibilisé".....	258
Figure 2.3.5.	Incorporation d'un UAA photo-activable dans un récepteur GluN1/GluN2A.	259
Figure 2.3.6.	Effets de l'UVs sur l'amplitude des courants portés par les récepteurs mutants, ayant incorporé un AzF ou un Bpa sur l'une de leurs sous-unités.....	260
Figure 2.3.7.	Les récepteurs ayant incorporé l'AzF sont fonctionnels.....	262
Figure 2.3.8.	Photo-inhibition du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF.....	263
Figure 2.3.9.	Photo-inhibition de GluN1wt/GluN2A-N697AzF en présence de zinc.....	265
Figure 2.3.10.	Probabilité d'ouverture de GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivé.....	266
Figure 2.3.11.	Affinité de GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivés pour le glutamate...	268
Figure 2.3.12.	Photo-pontage inter sous-unités du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF....	270
Figure 2.3.13.	Acides-aminés de GluN1 à proximité de l'AzF697 sur GluN2A.....	271
Figure 2.3.14.	Photo-inhibition du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF à pH acide.....	273
Figure 2.3.15.	Schéma-bilan des réarrangements conformationnels des interfaces entre ABDs de GluN1 et de GluN2A lors de l'inhibition par le zinc.....	276

Résumé

Les récepteurs NMDA (rNMDAs) forment une classe de récepteurs-canaux membranaires activés par le glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du système nerveux central des Vertébrés. Ces canaux ioniques perméables au calcium sont nécessaires à l'initiation de diverses formes de plasticité synaptique et sont impliqués dans diverses pathologies dont les attaques cérébrales, les douleurs chroniques et la schizophrénie. Les rNMDAs s'assemblent obligatoirement en hétérotétramères, associant généralement deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2, dont il existe quatre sous-types (A à D). Cette diversité moléculaire se répercute au niveau fonctionnel, chaque sous-type de récepteurs GluN1/GluN2 ayant des propriétés biophysiques (activation, perméation) et de signalisation qui lui sont propres. S'il est bien établi que le complexe récepteur tétramérique opère en dimère-de-dimères, l'ordre et la disposition des quatre sous-unités autour du pore central faisaient encore débat. Pourtant, déterminer précisément l'arrangement spatial des sous-unités dans un récepteur oligomérique est essentiel pour comprendre les mécanismes qui régissent son fonctionnement et notamment le rôle joué par les interfaces entre domaines et entre sous-unités. Cette description est d'autant plus critique dans le cas d'un rNMDA, qu'il s'agit d'un complexe hétéromérique massif (~580 kDa), dont chaque sous-unité est constituée de quatre domaines distincts semi-autonomes : le domaine N-terminal (NTD), le domaine de liaison des agonistes (ABD), le domaine transmembranaire (TMD) et le domaine C-terminal (CTD) cytoplasmique.

En combinant les techniques de modélisation moléculaire, de mutagenèse dirigée, de biochimie sur cystéines et d'électrophysiologie, nous avons tout d'abord montré que les sous-unités s'arrangeaient dans un rNMDA tétramérique selon un ordre alterné (type 1/2/1/2), avec les sous-unités identiques diamétralement opposées. Notre étude a aussi révélé l'existence d'une nouvelle interface inter-dimère, qui met en jeu des interactions entre les domaines ABDs des sous-unités GluN1. En marge des méthodes classiques utilisées au laboratoire, nous avons également montré qu'il était possible d'implémenter dans les ovocytes de *Xénope*, véhicule classique d'expression des récepteurs-canaux, une technique innovante consistant à incorporer un acide-aminé non-naturel photo-réactif dans un rNMDA. Cette approche, basée sur l'expansion du code génétique, nous a permis de créer les premiers rNMDAs directement sensibles à la lumière. Introduits à différentes interfaces entre sous-unités d'un récepteur GluN1/GluN2, ces acides-aminés non-naturels (UAAs), capables de photo-pontage, ont permis de révéler le rôle joué par deux interfaces entre sous-unités GluN1 et GluN2, et plus précisément : (1) par l'interface entre les lobes supérieurs des NTDs, dans le contrôle "sous-unité spécifique" de l'activité ; et (2) par l'interface entre les lobes inférieurs des ABDs, dans l'inhibition allostérique des récepteurs par le zinc extracellulaire.

Ces travaux apportent de nouvelles informations sur l'architecture moléculaire des rNMDAs et révèlent l'importance des réarrangements structuraux aux interfaces entre sous-unités voisines dans les différentes fonctions du récepteur. Ces données pourraient permettre, à terme, de développer de nouveaux composés thérapeutiques ciblant ces interfaces. Enfin, l'introduction de nouvelles fonctions chimiques par incorporation d'acides aminés non-naturels génétiquement encodés laisse entrevoir de nouvelles et nombreuses applications tant dans les études de structure-fonction des protéines membranaires que dans les approches d'optogénétique visant à contrôler par la lumière l'activité d'un récepteur neuronal spécifique dans son environnement natif.

Summary

NMDA receptors (NMDARs) are a major class of excitatory neurotransmitter receptors in the central nervous system of the Vertebrate. They form glutamate-gated ion channels that are highly permeable to calcium and essential mediator of synaptic plasticity. NMDAR dysfunction is involved in multiple brain disorders, including strokes, chronic pain and schizophrenia. NMDARs are obligatory heterotetramers composed of homologous but distinct subunits, usually two GluN1 and two GluN2 (A-D) subunits. This molecular diversity impacts on functions since each GluN1/GluN2 receptor subtype displays proper biophysical properties (activation, deactivation). Whereas it's well established that a tetrameric NMDAR operates as a dimer of dimers, subunit arrangement around the central pore is still debated. This issue is fundamental for the understanding of the mechanisms which govern NMDAR functions and the role of the interfaces between domains and between subunits. This pending question is even more important for the NMDAR, a massive heterotetrameric complex of which each subunit is built with four distinct semi-autonomous domains : the N-terminal domain (NTD), the agonist-binding domain (ABD), the transmembrane domain (TMD) and the C-terminal domain (CTD) .

By combining computational modeling, site-directed mutagenesis, electrophysiology, and cysteine cross-linking, we first showed that, in a full-length heterotetrameric NMDAR the subunit arrangement was alternated (1/2/1/2), with identical subunits facing each other. We also identified a new interdimer interface which involves interactions between the two GluN1 ABDs. In addition to classical methods, we used a new technique for which we demonstrated the feasibility in *Xenopus* oocytes (classical system for the expression of LGICs) and which consists in incorporating photoreactive unnatural amino-acids in NMDARs. By expanding genetic code in oocytes, we manage to create photosensitive NMDARs. Indeed, by incorporating a UAA at different positions in NMDAR subunits, we studied the photocrosslinking of this UAA to probe new interfaces between GluN1 and GluN2 and more precisely : (1) the role of the "upper lobe-upper lobe" interface between GluN1 and GluN2A-B NTDs in the subunit-specific channel activity ; and (2) the role of the lower lobe-lower lobe interface between GluN1 and GluN2A ABDs in the allosteric inhibition by extracellular zinc.

Our studies provide new information about molecular architecture of NMDARs and demonstrate the importance of some structural rearrangements between subunit interfaces for the receptor functions. These data could help to develop new therapeutic agents targeting these interfaces. Finally, introducing genetically encoded UAAs with new chemical functions in NMDAR subunits is really promising for studying the relations between structure and function in membrane proteins or for controlling the receptor activity by light, in a native environment.

Remerciements

Thomas Edison a dit : "le génie, c'est 1% d'inspiration et 99% de transpiration." Je dois avouer que même si j'ai l'habitude de transpirer lors de la pratique de mon sport de prédilection, le triathlon, les sciences demandent un effort hors du commun, de la persévérance et de l'abnégation sans mesure. Il y a quatre ans, j'étais sur la ligne départ, un peu stressée, et je m'apprête aujourd'hui à traverser la ligne d'arrivée, après des mois de découvertes, de surprises, de déceptions, de sourires, de partage, et quelques nuits sur le canapé deux places de la bibliothèque...

Dix années et quelques d'études... dix années de rencontres qui m'ont fait découvrir, aimer et contribuer à la recherche... Remercier en une page tous ceux qui m'ont encouragée, appris et aidée, sera difficile! J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury qui m'ont fait l'immense plaisir d'examiner mon travail et qui ont pris du temps pour faire de cette journée du 28 février 2014 une journée mémorable. Merci donc à Pierre Charnet et David Perrais, rapporteurs, Antoine Taly, examinateur, Germain Trugnan, Président de ce Jury et bien entendu Pierre Paoletti, mon Directeur de thèse et mentor durant ces quatre dernières années.

Je te suis profondément reconnaissante, Pierre, de m'avoir fait confiance dès le début, moi qui sortais d'une école d'ingénieurs, et sans connaissance très approfondie des neurosciences ! J'ai apprécié ton professionnalisme, tes compétences, ton abnégation, ton honnêteté, autant de qualités qui font de toi un grand chercheur et un directeur de thèse efficace et sensé. Outre l'aspect purement biologique, tu m'as enseigné la rigueur, la précision, le justesse, des vertus qui sont essentielles à la recherche. Tu m'as aidée à développer mon esprit critique et mon sens de l'analyse et de l'innovation qui me seront très utiles dans mon futur travail. Encore merci.

Je tiens aussi à remercier, bien entendu, tout l'équipe des "Récepteurs du Glutamate" : Angela, pour tes petits mots toujours réconfortants ; Stéphanie, toi qui m'as appris les techniques essentielles de biologie moléculaire et de biochimie (depuis les western-blots sont devenus ma spécialité !) ; Andrea, pour ces longues discussions, scientifiques et extrascientifiques (tes connaissances incommensurables, tes analyses critiques, m'ont toujours

ébahie !) ; David, pour tes conseils, ta disponibilité, ta bonne humeur, ta motivation sans faille, ces longues discussions sur mes résultats, mes doutes et mes découvertes, et bien sûr pour notre collaboration sur l'article de PLoS ONE ; Shujia, ma "binôme" de thèse, nous sommes arrivées quasiment ensemble et nous repartons ensemble, merci pour ta disponibilité, ton aide, ton professionnalisme, ton sourire, et ces nombreuses découvertes culinaires ; Shixin, ma "chef numéro 2" pour la deuxième partie de ma thèse, merci pour ta gentillesse, ton aide, tes idées, pour ces bons moments partagés à discuter de tout et de rien (et souvent de science tout de même). Je remercie également, Laetitia, qui avant son départ, a eu le temps de m'apprendre les bases de mon travail dans le laboratoire : opérer une grenouille, injecter des ovocytes, se servir d'un poste d'électrophysiologie..., Pierre C., un vent de jeunesse qui ne tardera pas à revenir, Myelin, la petite nouvelle, toujours souriante et attentionnée, Eszter toujours motivée et déterminée. Merci également à tout le 9^e étage pour l'ambiance que vous faites régner ! Je n'oublie pas non plus ceux qui m'ont fait redécouvrir la biologie et découvrir les neurosciences, et plus particulièrement Pierre Charnay, mon professeur de neurosciences à l'Ecole polytechnique.

Un grand merci à la Direction Générale de l'Armement de m'avoir autorisée à suivre le cursus de la formation par la recherche pendant ces quatre dernières années, et de m'avoir accordé ces six mois supplémentaires pour terminer ma thèse dans de bonnes conditions. De la nouveauté m'attend maintenant, du côté de Vert le Petit !

Enfin, mille mercis à mes parents pour leur soutien infaillible pendant toutes mes études et plus particulièrement ces derniers mois au cours desquels leur aide a été primordiale. Un grand merci également à ma famille, notamment mes deux sœurs, Emmanuelle et Solenn, Jérémy et Julien pour leur soutien indispensable. Et je n'oublie pas bien entendu mes amis qui, ces quatre dernières années, ont souvent dû faire preuve de... compréhension !!

"Le biologiste passe, la grenouille reste" (Jean Rostand)... Et je n'oublierai jamais ce passage si enrichissant !

Avant-Propos

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS) sous la direction de Pierre Paoletti.

Le manuscrit se divise en deux chapitres principaux. Le premier est une introduction générale sur les récepteurs-canaux (ou récepteurs ionotropiques, LGICs), avec un intérêt tout particulier porté sur les récepteurs-canaux (ou ionotropiques) du glutamate (iGluRs). J'y détaille la diversité des sous-unités et des sous-types d'iGluRs, ainsi que les propriétés biophysiques et pharmacologiques des récepteur. L'accent a été porté sur l'organisation structurale de ces complexes tétramériques, décrite à partir de la structure cristallographique d'un récepteur AMPA entier récemment publiée. Dans un paragraphe distinct, je présente l'état de nos connaissances sur les mécanismes d'assemblage des récepteurs-canaux, et plus précisément les récepteurs-canaux du glutamate, en distinguant récepteurs homomériques et récepteurs hétéromériques. Enfin, dans une dernière partie, je présente une technique innovante que nous utilisons depuis trois ans au laboratoire : il s'agit de la mutagenèse d'acides-aminés non-naturels (UAAs). L'incorporation de ces UAAs dans une protéine, grâce à la variété d'applications qu'elle propose permet notamment d'en étudier les relations structures-fonctions.

Le second chapitre de ce manuscrit porte sur les résultats obtenus au cours de ma thèse. Il comporte une première partie qui traite de l'arrangement des sous-unités au sein d'un récepteur NDMA entier hétérotétramérique. Ce travail a fait l'objet d'une publication en avril 2012, dans laquelle je décris la façon dont deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2A s'arrangent autour du pore du canal ionique. Une seconde partie est consacrée aux applications de l'expansion du code génétique dans les ovocytes de *Xénope*, dont Shixin Ye et moi-même (second auteur) avons montré la faisabilité. Dans un premier temps, en incorporant un UAA photo-réactif à l'interface de dimérisation des NTDs, nous sommes parvenus à créer des récepteurs NMDA photo-sensibles, et mettre ainsi en évidence l'importance du dimère de

NTDs dans la spécification des fonctions d'un rNMDA en fonction des sous-unités qui le compose. Ce travail a fait l'objet d'un article que nous avons récemment soumis et qui est actuellement en révision. Dans un second temps, nous avons introduit un UAA photo-réactif à l'interface de dimérisation des lobes inférieurs des ABDs, dans le but d'étudier les changements conformationnels de cette interface et son rôle lors de l'inhibition des récepteurs NMDA de type GluN1/GluN2A par le zinc. Nous sommes ainsi parvenus à piéger les récepteurs NMDA dans un état conformationnel particulier, c'est-à-dire à rendre ces récepteurs photo-sensibles de façon "état-dépendant". Nous envisageons de soumettre un manuscrit de ces données lorsque cette étude sera terminée.

Première Partie

INTRODUCTION



1. INTRODUCTION SUR LES RECEPTEURS-CANAUUX

Les canaux ioniques activés par des ligands ("Ligand-gated ion channels" ou LGICs) aussi appelés récepteurs ionotropiques ou récepteurs-canaux sont des protéines transmembranaires organisées autour d'un pore central qui permet un flux régulier d'ions à travers la membrane plasmique en réponse à la liaison d'un messenger chimique (i.e. un ligand, tels que les neurotransmetteurs). Ils sont exprimés dans tous les types cellulaires, notamment les cellules nerveuses, musculaires et épithéliales. Par convention, l'appellation LGICs regroupe à la fois des récepteurs ionotropiques excitateurs, perméables aux cations, et des récepteurs ionotropiques inhibiteurs, perméables aux anions. Dans le système nerveux et aux jonctions neuromusculaires, les LGICs sont responsables de la transmission synaptique rapide, agissant à l'échelle de la milliseconde. Cette conversion rapide de l'énergie chimique en énergie mécanique d'activation est essentielle à la neurotransmission. Les LGICs, en tant que protéines membranaires et canaux ioniques, partagent un long passé avec ces derniers. Les canaux ioniques sont des protéines impliquées dans de multiples processus biologiques, notamment la communication entre les environnements intracellulaire et extracellulaire, et le contrôle des propriétés électriques de la cellule (potentiel de repos de la membrane plasmique et excitabilité). Dans ce chapitre, nous rappellerons rapidement l'historique de la recherche sur les canaux ioniques, puis nous présenterons brièvement les différentes classes (ou superfamilles) de LGICs, leur composition en sous-unités, leur architecture moléculaire et leurs mécanismes d'activation.

1.1. Bref historique de la recherche sur les canaux ioniques

Un canal ionique est une protéine membranaire formant une structure macromoléculaire, un pore aqueux, incrusté dans la bicouche lipidique. En réponse à certains signaux, les canaux ioniques changent de conformation, ce qui aboutit à l'ouverture d'une porte d'activation (ou "gate" en anglais) et au passage subséquent des ions, cations ou anions, de part et d'autre de la bicouche membranaire. Ces signaux peuvent être la liaison de ligands chimiques

extracellulaires ou intracellulaires, un changement de potentiel transmembranaire, un changement de température ou une force mécanique (Fig. 1.1 ; Hille, 2001).

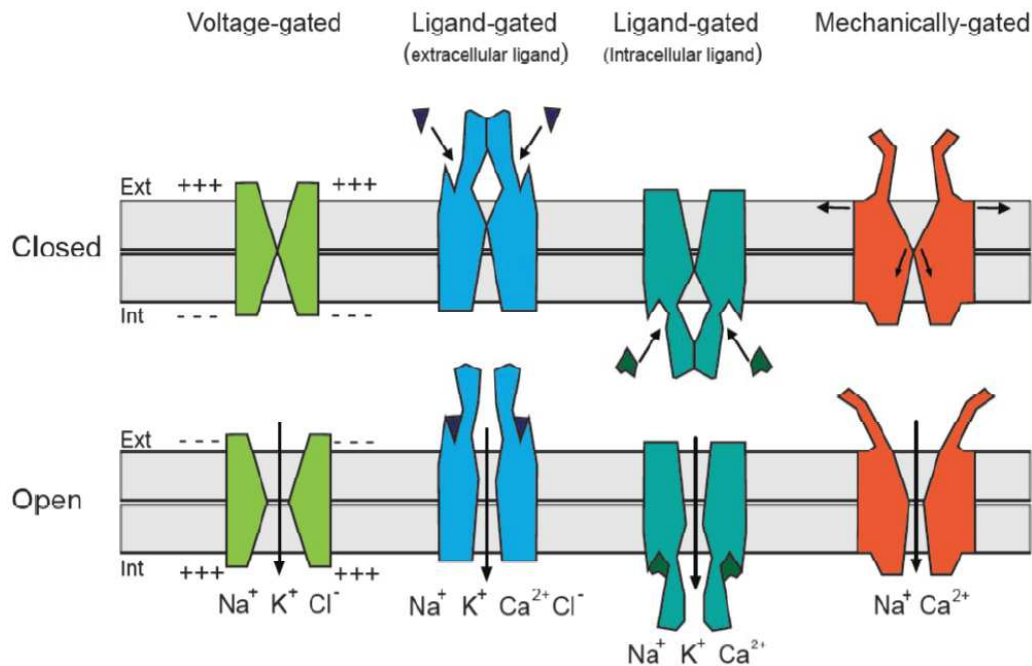


Figure 1.1. Les canaux ioniques : des protéines membranaires activées par divers signaux, physiques (variation de potentiel membranaire (vert), changement de température, force mécanique (rouge)) ou chimique (ligand extracellulaire (bleu-électrique) ou intracellulaire (bleu-paon)).

L'importance des ions dans l'excitabilité nerveuse et musculaire est reconnue depuis longtemps. Au début des années 1880, le clinicien et pharmacologiste britannique Sydney Ringer publia quatre papiers dans *The Journal of Physiology*, montrant que des organes isolés (comme le cœur) pouvaient rester fonctionnels de longs moments s'ils étaient conservés avec une petite quantité d'ions sodium, potassium et calcium, grâce à une perfusion (DeWolf, 1977). Deux décennies plus tard, en 1902, le physiologiste allemand Julius Bernstein publia sa "Membrane Theory of Electrical Potentials" applicable aux cellules et tissus biologiques. Selon lui, les cellules excitables sont entourées d'une membrane sélectivement perméable aux ions K^+ pendant les phases de repos et perméable aux autres ions au cours de l'excitation.

Des études fonctionnelles menées entre les années 1945 et 1970 ont révélé la présence de canaux activés par le potentiel et de canaux activés par des ligands, dans les membranes plasmiques de cellules nerveuses et musculaires. Les propriétés fondamentales des courants membranaires créés par le passage des ions à travers les canaux ioniques ont été analysées cinquante ans plus tard par les biophysiciens anglais Alan L. Hodgkin et Andrew F. Huxley, ce qui leur a valu un Prix Nobel en 1963. En 1952, ils mirent en évidence grâce à la technique de "voltage-clamp" les propriétés cinétiques caractérisant l'ouverture des canaux sodiques et potassiques dans l'axone géant de calmar, et décrivent les mécanismes sous-jacents au déclenchement de potentiels d'action grâce auxquels l'information est propagée dans le système nerveux (Hodgkin & Huxley, 1952). En 1966, Bernard Katz et ses collègues déterminèrent les lois cinétiques régissant l'ouverture des récepteurs nicotiques activés par l'acétylcholine (nAChRs) aux jonctions neuromusculaires de la grenouille (Katz, 1966). Plus tard, dans les années 1971, l'existence des canaux ioniques a été confirmée par Bernard Katz et Ricardo Miledi en mesurant pour la première fois la conductance unitaire de récepteurs-canaux à acétylcholine. Dans les mêmes moments, la première purification d'un récepteur nicotinique de l'acétylcholine par J.P. Changeux et ses collègues permit d'en élucider la structure primaire (Changeux et al., 1970). La détection fonctionnelle des canaux ioniques dans des cellules fut montrée plus directement en 1976, grâce à la technique connue sous le nom de "patch-clamp" (Hamill et al., 1981 ; Neher & Sakmann, 1976), qui a valu un Prix Nobel à Erwin Neher et Bert Sakmann. Ces expériences de "patch-clamp" ont montré que les transitions entre les états ouvert et fermé d'un canal ionique individuel étaient des événements soudains et du "tout-ou-rien", durant lesquels la protéine, flexible, passait très rapidement (en quelques dizaines de μ s) d'une conformation à une autre. Ces résultats sont la confirmation finale de l'existence des canaux ioniques (Fig. 1.2.).

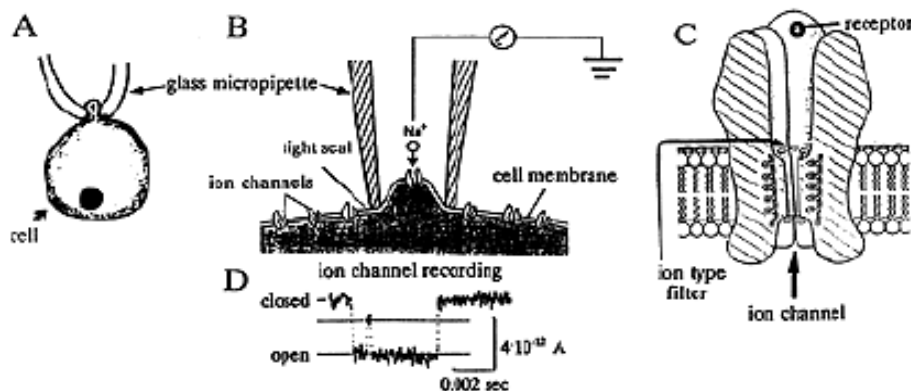


Figure 1.2. Diagramme illustrant le courant passant au travers d'un canal unique d'un récepteur-canal de l'acétylcholine enregistré par la technique du "patch-clamp".

Progressivement, avec l'explosion du clonage et du séquençage dans les années 80, notamment de la première sous-unité d'un récepteur nicotinique à l'acétylcholine (nAChR) présente à la jonction-musculaire (Noda et al., 1983), une attention croissante s'est portée sur les études structurales et fonctionnelles des canaux ioniques. Une année plus tard, le canal sodique était à son tour cloné (Noda et al., 1984), puis la séquence primaire du canal potassique Shaker obtenue quatre années plus tard (Pongs et al., 1988 ; Tempel et al., 1988). La détermination des séquences primaires a fourni des informations essentielles concernant la structure et la topologie membranaire des canaux ioniques. La combinaison de biologie moléculaire (mutagenèse dirigée), de biochimie et d'études fonctionnelles (électrophysiologie essentiellement), a conduit à une explosion des connaissances mécanistiques des canaux ioniques. Elles ont permis de répondre à des problématiques essentielles, concernant notamment les mécanismes de sélectivité ionique, les mécanismes d'activation et la transduction des différents signaux (potentiel, ligand, force mécanique, température), en ouverture du canal (pour les canaux activés par le potentiel (Yellen, 1998), les nAChRs (Corringer et al., 2000), les récepteurs-canaux du glutamate (Dingledine et al., 1999), les canaux mécano-sensibles (Hamill, 2006 ; Hu & Sachs, 1997)).

En dépit des connaissances fonctionnelles, ce n'est qu'à la fin des années 90 que les premières structures tridimensionnelles des canaux ioniques ont été résolues, notamment parce qu'il est difficile de cristalliser de telles protéines membranaires complexes. En 1998, MacKinnon et ses collègues publient la première structure cristallographique d'un canal potassique procaryote KcsA, et mettent alors en évidence les bases moléculaires de la conduction sélective des canaux potassiques (Doyle et al., 1998). Quatre années plus tard, la structure cristallographique d'un canal chlore procaryote est dévoilée, par le même groupe (Dutzler et al., 2002). Puis des structures plus complexes, telles que les canaux potassiques activés par le potentiel (Jiang et al., 2003 ; Long et al., 2005 ; Schmidt et al., 2006) sont publiées. Ces dernières structures ont permis de mieux comprendre le couplage qui existe entre le canal ionique en tant que tel et les régions du récepteur sensibles aux stimuli. Le Prix Nobel de Chimie de 2003 fut remis à Roderick MacKinnon et Peter Agre pour leurs études remarquables sur les bases moléculaires et structurales de la perméabilité ionique et aqueuse des membranes biologiques. Plus récemment, les structures complètes de plusieurs récepteurs-canaux ont été obtenues à une résolution atomique (Bocquet et al., 2009 ; Hilf et Dutzler, 2008 ; Kawate et al., 2009 ; Sobolevsky et al., 2009). Dans la figure 1.3, sont

représentées les structures de plusieurs récepteurs-canaux dont celle du récepteur AMPA (rAMPA) GluA2 de rat, celle du récepteur de poisson-zèbre P2X₄ activé par l'ATP, celle du nAChR, et également les structures d'un canal potassique activé par le potentiel (famille des canaux Shaker) et du récepteur couplé aux protéines G (RCPG) rhodopsine (Fehrentz et al., 2011). L'exploration des structures combinée à des études fonctionnelles et de modélisation détaillées révèle petit à petit une diversité étonnante de modulation allostérique, de pharmacologie, de mécanismes d'activation et de dynamiques conformationnelles parmi les différentes familles de canaux ioniques.

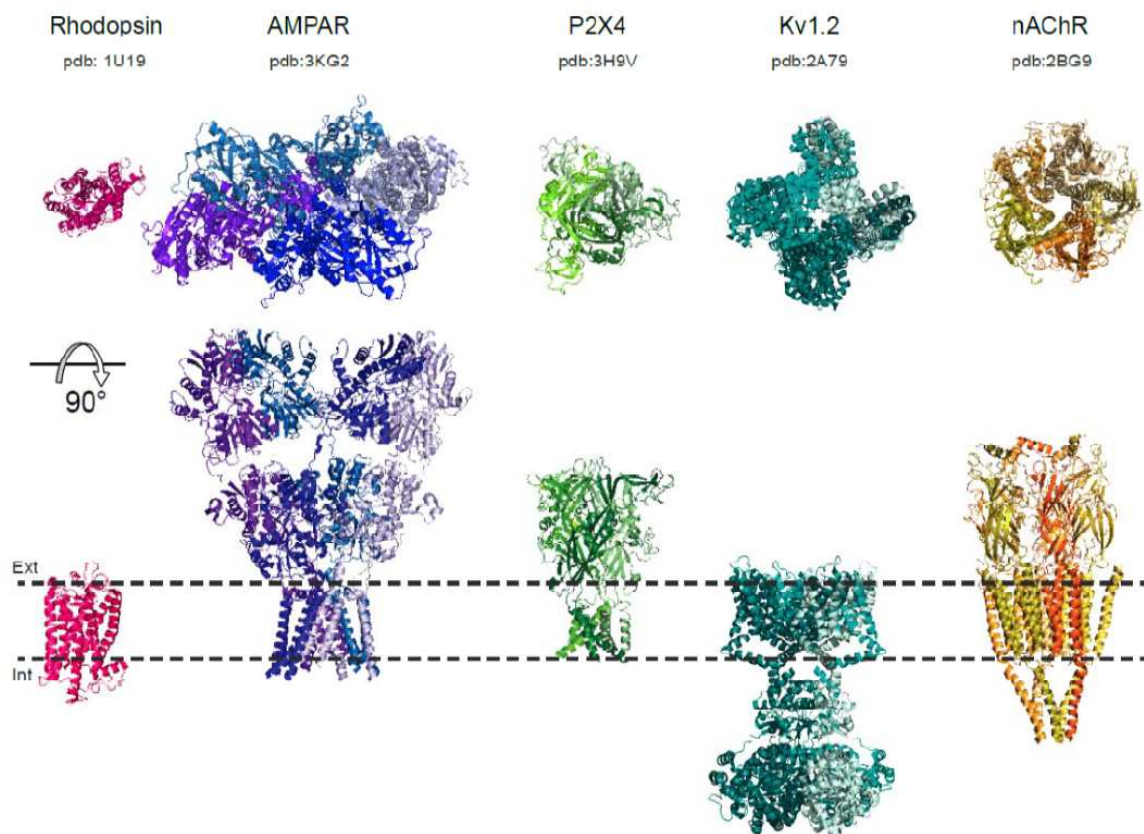


Figure 1.3. Structure de plusieurs récepteurs membranaires dont ceux représentant les trois classes de récepteurs-canaux. Chaque récepteur est représenté à la même échelle et selon les vues de dessus et latérale. De gauche à droite sont représentés : la rhodopsine (un RCPG), le récepteur homomérique GluA2 (un iGluR), le récepteur homomérique P2X₄ (récepteur excitateur activé par l'ATP), la canal potassique SHAKER, et le récepteur nicotinique de l'acétylcholine exprimé aux jonctions neuromusculaires. Structures obtenues par cristallographie à l'exception du nAChR (cryo-microscopie électronique). *D'après Fehrentz et al., 2011.*

1.2. Aperçu général des canaux ioniques activés par les ligands

Selon la nomenclature et la classification établies par l'union NC-IUPHAR (International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification), les récepteurs-canaux ou LGICs regroupent des récepteurs excitateurs, les récepteurs-canaux (ou ionotropiques) du glutamate (iGluRs, Traynelis et al., 2010), les récepteurs nicotiques à acétylcholine (nAChRs ; Changeux, 2010 ; Millar & Gotti, 2009), les récepteurs sérotoninergiques (5-HT₃Rs ; Barnes et al., 2009 ; Walstab et al., 2010), les récepteurs à ATP (P2XRs ; Jarvis & Khakh, 2009 ; Surprenant & North, 2009) ; et des récepteurs inhibiteurs, les récepteurs GABA_A (GABA_ARs ; Belelli & al., 2009 ; Olsen & Sieghart, 2009) et les récepteurs glycinergiques (GlyRs ; Lynch, 2009 ; Yevenes & Zeihlofer, 2011). Les LGICs peuvent aussi être classés en récepteurs trimériques (P2XRs), tétramériques (iGluRs), ou pentamériques (nAChRs, 5-HT₃Rs, GABA_ARs et GlyRs ; aussi nommés récepteurs cys-loop), selon leur topologie membranaire et leur stœchiométrie d'assemblage en sous-unités.

Les récepteurs-canaux jouent un rôle central dans la transmission synaptique rapide au niveau des synapses du SNC (Fig.1.4). Ils traduisent les messages chimiques en réponses électriques, assurant ainsi la transmission de l'information d'un neurone à l'autre. Leur rôle dans la communication neuronale est lié à leur capacité à répondre très rapidement à la libération pré-synaptique, transitoire, de neurotransmetteurs qui activent alors les récepteurs-canaux post-synaptiques (Lemoine et al., 2012 ; Smart & Paoletti, 2012). De cette activation naît un signal électrique rapide appelé potentiel post-synaptique excitateur (PPSE) ou inhibiteur (PPSI). Outre leur traditionnel rôle dans la neurotransmission phasique, il a été montré que certains récepteurs-canaux intervenaient également dans la partie tonique de la régulation neuronale, qui est due à l'activation de récepteurs-canaux extra-synaptiques par des niveaux ambiants de neurotransmetteurs.

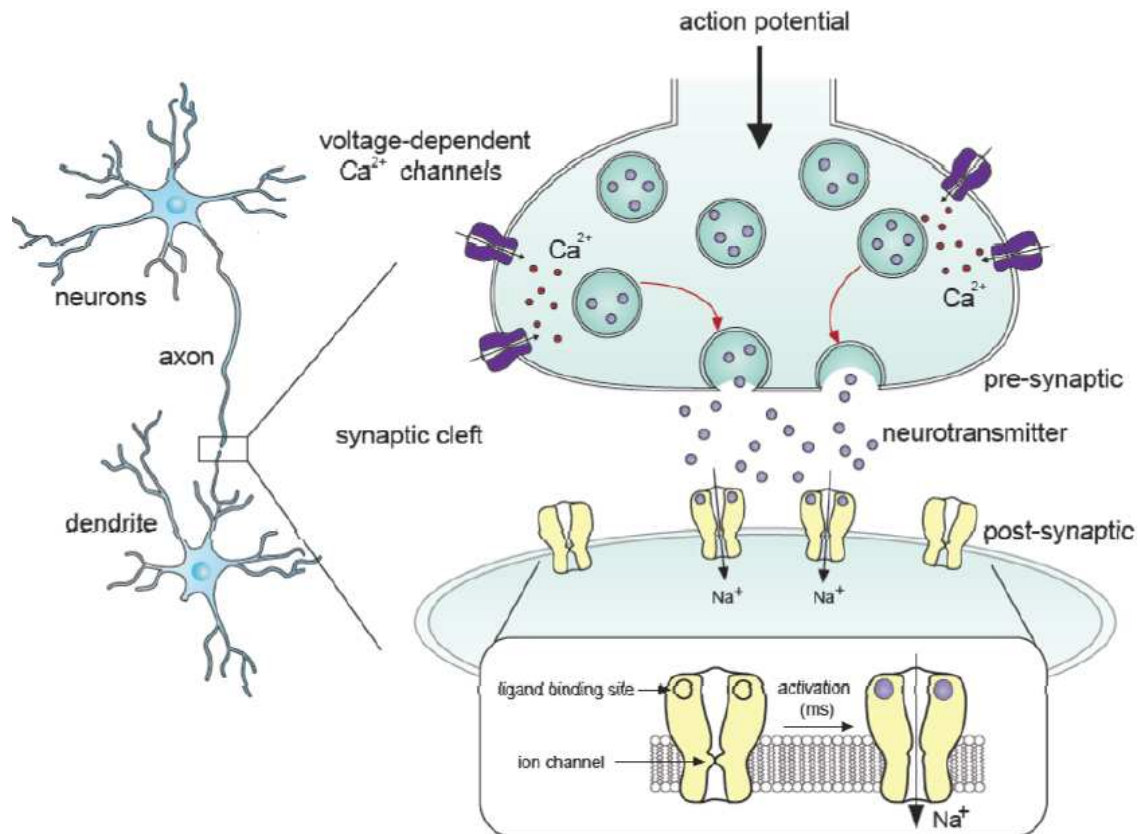


Figure 1.4. Rôles des récepteurs-canaux dans la transmission neuronale. L'arrivée d'un potentiel d'action dans le neurone pré-synaptique déclenche l'ouverture de canaux calciques membranaires dépendant du potentiel. L'entrée de calcium induit la fusion des vésicules remplies de neurotransmetteurs avec la membrane du neurone pré-synaptique, et la libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Les récepteurs-canaux situés sur la membrane post-synaptique et sensibles aux neurotransmetteurs libérés vont alors lier le neurotransmetteur déclenchant leur ouverture rapide (<1 ms) et permettant ainsi le passage des ions à travers le canal.

Les récepteurs-canaux partagent plusieurs caractéristiques communes, mais chaque classe possède aussi ses particularités. Les récepteurs-canaux forment de larges complexes multimériques composés de sous-unités homologues s'arrangeant autour d'un pore central ou d'un canal ionique (Fig. 1.5). Le canal est ainsi isolé de l'environnement lipidique de la membrane, ce qui est essentiel pour avoir des flux ioniques rapides et un accès direct au solvant. Les récepteurs-canaux sont composés d'un large domaine extracellulaire éloigné de la membrane et qui comporte les sites de liaison aux neurotransmetteurs, du canal ionique dont la structure s'appuie sur un agencement d'hélices transmembranaires, et d'un domaine intracellulaire spécialisé dans l'ancrage à la membrane et l'association aux protéines de

signalisation cytoplasmique. Chaque famille de récepteurs-canaux, est constituée de multiples sous-unités qui s'assemblent pour former un récepteur entier fonctionnel. De nombreuses combinaisons entre ces sous-unités sont possibles, ce qui explique la diversité des récepteurs-canaux et de leurs propriétés fonctionnelles (biophysiques, pharmacologiques, de signalisation) distinctes. Il n'en reste pas moins que les trois classes de récepteurs-canaux se distinguent sur certaines propriétés structurales essentielles : le nombre de sous-unités par complexe récepteur, la localisation des sites de liaison des agonistes (à l'interface entre sous-unités ou pas) ou les mécanismes d'activation. Dans la suite, nous regarderons de plus près les différences majeures entre les récepteurs trimériques, tétramériques et pentamériques.

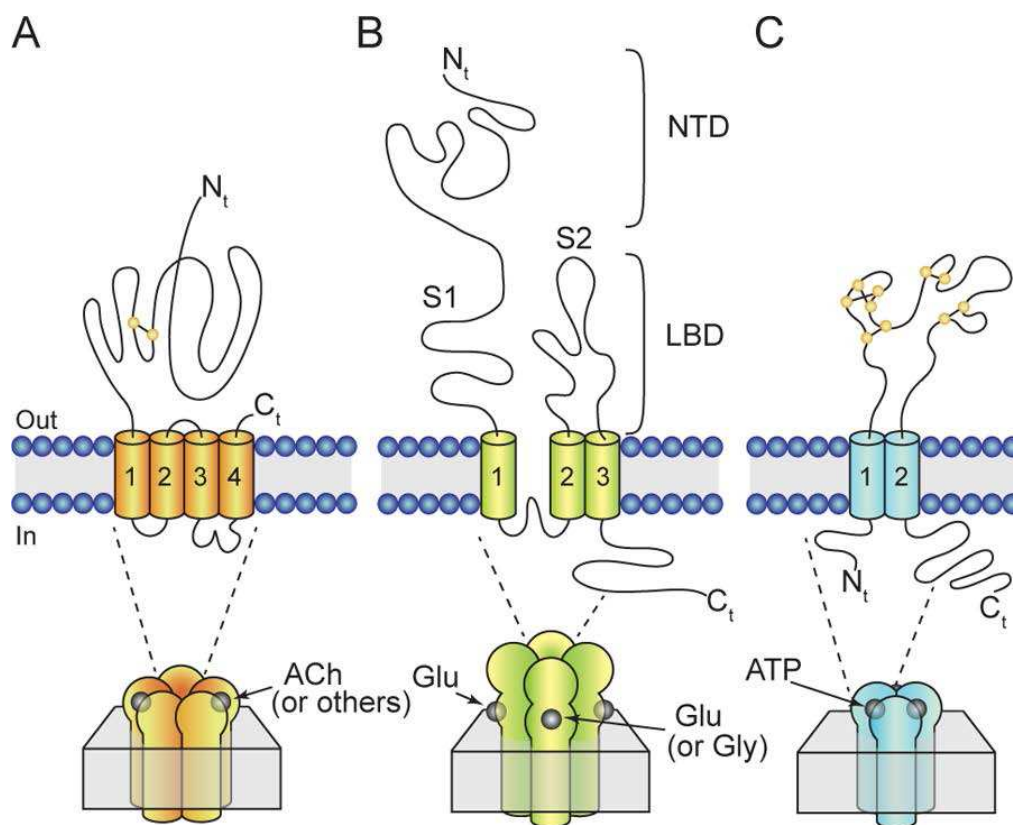


Figure 1.5. Représentation schématique de la topologie membranaire et de la stœchiométrie d'assemblage des sous-unités des trois classes de récepteurs-canaux. **A.** Récepteurs pentamériques, incluant les nAChRs, les 5-HT₃Rs, les GABA_ARs, les GlyRs et les ZAC, GluCl, GLIC, ELIC. **B.** Récepteurs tétramériques iGluRs, incluant les rNMDAs, rAMPA et rKAs. **C.** Récepteurs trimériques P2X. *D'après Lemoine et al., 2012*

1.3. Les récepteurs-canaux trimériques

Les récepteurs-canaux trimériques ou récepteurs P2X sont activés par l'ATP extracellulaire et perméables aux cations. Ils appartiennent à la famille plus large des récepteurs purinergiques. Sept gènes nommés P2X (1-7) encodent sept sous-types de sous-unités de récepteurs P2X, longues de 280 à 600 acides-aminés. Ces sous-unités sont exprimées dans divers organismes eucaryotes tels que l'ours d'eau (*Hypsibius dujardini*, Bavan et al., 2009), l'algue verte (*Ostreococcus tauri*, Fountain et al., 2008), l'amibe sociale (*Dictyostelium discoideum*, Fountain et al., 2007), le ver plat (*Schistosoma mansoni*, Agboh et al., 2004), le poisson-zèbre (*Danio rerio*, Diaz-Hernandez et al., 2002) et les mammifères (Brake et al., 1994 ; Valera et al., 1994). Cependant, aucun récepteur P2X n'a été reporté dans les organismes procaryotes, ce qui est plutôt surprenant quand on sait que les récepteurs tétramériques et les récepteurs pentamériques sont présents de façon évolutive, des bactéries aux humains.

La première structure cristallographique d'un récepteur P2X (le sous-type P2X₄, d'un poisson-zèbre), a constitué une avancée majeure dans notre connaissance de cette superfamille de récepteurs. La structure a "capturé" l'état fermé (de repos) du récepteur, à une résolution de 3.5 Å (Kawate et al., 2009). Les récepteurs P2X s'organisent selon une symétrie d'ordre trois et forment des trimères aussi bien homomériques que hétéromériques. Chaque sous-unité du trimère contient un large domaine extracellulaire qui est le siège d'un grand nombre d'interactions inter-sous-unités, deux domaines transmembranaires et des extrémités C- et N-terminales intracellulaires (Coddou et al., 2011). Plus récemment, la structure de l'état actif d'un récepteur P2X₄ de poisson-zèbre a été résolue (Hattori & Gouaux, 2012), avec ses trois sites de liaison à l'ATP bien définis et localisés aux interfaces entre les trois sous-unités. Combinées à des études fonctionnelles, ces premières structures révèlent petit à petit des éléments des mécanismes structuraux permettant de traduire la liaison de l'ATP en réarrangement des sous-unités au sein du complexe trimérique et *in fine* en activation (i.e. ouverture) du canal ionique (Fig. 1.6 ; Browne et al., 2011; Jiang et al., 2011 ; Li et al., 2010).

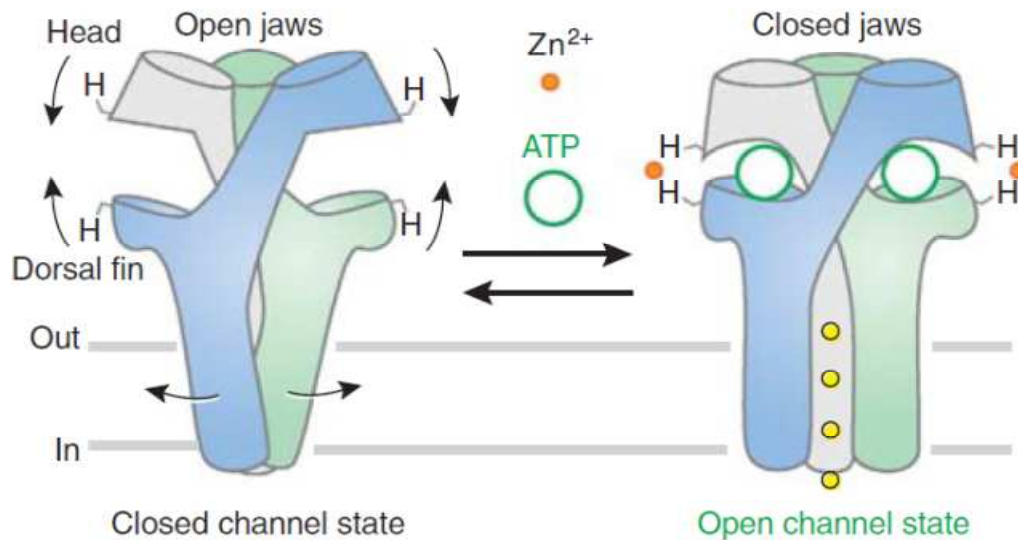


Figure 1.6. Mécanisme d'activation proposé pour le récepteur P2X. La liaison de l'agoniste à l'interface entre sous-unités induit la fermeture des « mâchoires » formant les sites de liaison à l'ATP, mouvement qui est intimement couplé à l'ouverture du canal. Les ions Zn²⁺, qui agissent comme modulateurs allostériques positifs, stabilisent la conformation fermée de ces « mâchoires » par l'intermédiaire d'un site de coordination du zinc formé par deux histidines placées de part et d'autre de la « mâchoire ». D'après Jiang et al., 2012.

Les récepteurs P2X sont abondamment distribués dans le cerveau, à la fois dans les neurones et les cellules gliales, dans les glandes épithéliales, endothéliales, l'épithélium des voies respiratoires, le foie, les os et les muscles (North, 2002). Ils sont impliqués dans divers processus physiologiques et pathologiques (Surprenant & North, 2009). Ces récepteurs sont des cibles d'intérêt thérapeutique intéressantes et selon leur composition en sous-unités, les récepteurs P2X possèdent des propriétés biophysiques et pharmacologiques variables (Gever et al., 2006), dont différentes affinités pour l'ATP, pour les antagonistes (comme le PPADS, pyridoxalalphosphate-6-azophenyl-2', 4'-disulphonic acid et le suramine) et pour les modulateurs allostériques (comme le proton extracellulaire et des métaux lourds, notamment le zinc et le cadmium ; Evans, 2009 ; Khakh et al., 1999 ; North, 2002). Des études futures sur les mécanismes d'activation et les modulations allostériques nous aideront à mieux comprendre les bases moléculaires qui régissent le fonctionnement des récepteurs P2X, et devraient apporter des informations essentielles à la compréhension de leurs rôles dans certaines affections neurologiques, notamment la douleur, tout comme dans la régulation du flux sanguin dans les reins, et l'inflammation.

1.4. Les récepteurs-canaux tétramériques

La superfamille des récepteurs-canaux tétramériques est formée par les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), qui sont répartis en quatre sous-familles : les récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionique acid ou rAMPA), les récepteurs kainate (rKAs), les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate ou rNMDAs) et les récepteurs delta (δ R). Les iGluRs s'assemblent en homomères ou en hétérotétramères. Dans les mammifères, ils sont encodés par 18 gènes : GluA1-4 (rAMPA), GluK1-5 (rKA), GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B (rNMDA) et GluD1-2 (δ R) (Dingledine et al., 1999 ; Traynelis et al., 2010). Les récepteurs GluD, que l'on considère comme des récepteurs orphelins, partagent 14 à 24% d'homologie de séquence avec les sous-unités des rAMPAs, rKAs et rNMDAs. Cependant, ils ne lient pas le glutamate et leurs fonctions physiologiques sont encore mal définies (Traynelis et al., 2010 ; Williams et al., 2003).

Le rAMPA homomérique de rat, contenant la sous-unité GluA2, a été le premier, et est actuellement le seul, iGluR entier (ou quasi-entier), à avoir été cristallisé (Sobolevsky et al., 2009) (voir Introduction **2.2.6.2**). Concernant l'architecture globale, les iGluRs sont constitués de quatre sous-unités homologues arrangées en quatre couches distinctes (Mayer, 2006, 2011a et 2011b ; Paoletti, 2011) : deux larges domaines extracellulaires bilobés, le domaine N-terminal (NTD), qui est impliqué dans l'assemblage des sous-unités et la modulation allostérique, et le domaine de liaison des agonistes (ABD) ; un domaine membranaire constitué de trois segments transmembranaires (M1, M3 et M4) et une petite boucle réentrante (P-loop ou M2), qui forment le canal ionique et le filtre de sélectivité ; et un domaine C-terminal (CTD), dont la taille varie beaucoup entre les sous-unités, et qui est impliqué dans le transport du récepteur, son ancrage membranaire et son couplage aux molécules de signalisation intracellulaire. Contrairement aux récepteurs trimériques ou pentamériques, les iGluRs ont leur site de liaison des agonistes enfoui dans chaque sous-unité (et non aux interfaces entre sous-unités) (Armstrong et al., 1998 ; Furukawa et al., 2005 ; Sobolevsky et al., 2009). Chaque tétramère comprend donc quatre sites de liaison des agonistes. La diversité de leurs propriétés pharmacologiques, d'activation et de signalisation font que les iGluRs sont impliqués dans de très nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ils sont principalement responsables de la transmission excitatrice rapide et fortement impliqués dans la plasticité synaptique. Mis en cause dans diverses désordres

neurologiques (épilepsie, neurodégénérescence, douleur) et psychiatriques (schizophrénie, dépression, autisme), les iGluRs suscitent un vif intérêt dans le domaine médical et sont considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre ces maladies (Kemp & McKernan, 2002 ; Paoletti et al., 2013 ; Paoletti & Neyton, 2007 ; et voir Introduction **2.2.5.5.** concernant les rNMDAs).

1.5. Les récepteurs-canaux pentamériques

La superfamille de récepteurs pentamériques de vertébrés se compose des récepteurs excitateurs, perméables aux cations, les nAChRs, les récepteurs sérotoninergiques (5-HT₃) et les récepteurs activés par le zinc (ZAC), et des récepteurs inhibiteurs, perméables aux anions, les récepteurs γ -aminobutyric acide (GABA_A, GABA_C) et les récepteurs glycinergiques (GlyRs) (Fig. 1.7 ; Corringer et al., 2012 ; Thompson et al., 2010).

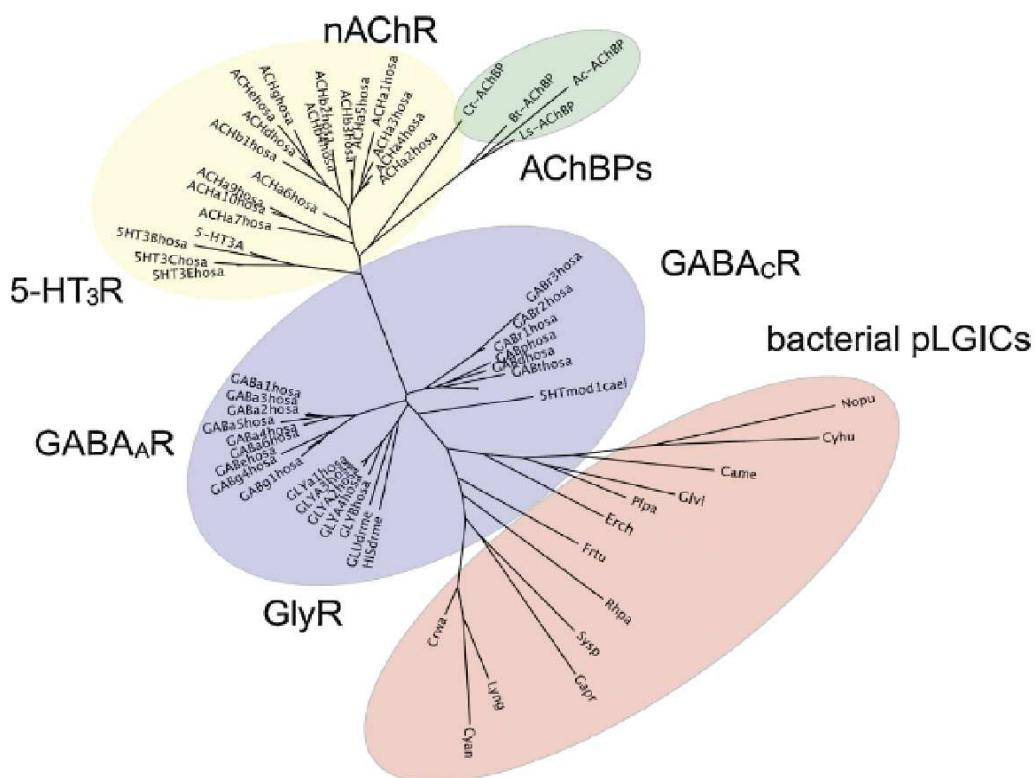


Figure 1.7. Arbre phylogénétique des différents membres de la superfamille des récepteurs pentamériques (eucaryotes et procaryotes). On distingue quatre sous-groupes : les récepteurs eucaryotes excitateurs (jaune); les protéines de liaison à l'acétylcholine (vert), les récepteurs eucaryotes inhibiteurs (bleu) ; et les homologues procaryotes (rouge). *D'après Nys et al., 2013.*

On les nomme aussi récepteurs "cys-loop" en raison d'une boucle conservée de treize acides-aminés du domaine extracellulaire de chaque sous-unité, maintenue par un pont disulfure (Miller & Smart, 2010 ; Thompson et al., 2010). Cette boucle est essentielle à la communication entre les sites de liaison des neurotransmetteurs et le canal ionique membranaire. Cependant, leurs ancêtres procaryotes ne contenant pas de telle boucle, l'expression "récepteur pentamérique" (ou pLGICs pour "pentameric ligand-gated ion channels") est maintenant préférée (Hilf & Dutzler, 2008). Ces récepteurs peuvent s'assembler en homo-pentamères mais on les rencontre plus communément sous forme d'hétéropentamères. La multitude de combinaisons possibles entre les différentes sous-unités implique une grande richesse moléculaire et fonctionnelle *in vivo* (Sine & Engel, 2006). Chez les invertébrés, d'autres membres de cette classe de récepteurs-canaux ont été identifiés. Cela inclut les canaux chlore activés par l'acétylcholine, par le glutamate (récepteurs GluCl), par l'histamine ou par la 5-HT (Raymond & Sattelle, 2002).

Concernant les nAChRs, une partie importante de nos connaissances provient des études faites sur l'organe électrique de la raie *Torpedo* (Fig. 1.8, **gauche**). En raison de la densité importante de nAChRs qu'on y trouve, il a été possible d'obtenir, par cryomicroscopie électronique, de nombreuses images à haute résolution des nAChRs (Miyazawa et al., 2003). Ces récepteurs de *Torpedo* sont d'autant plus intéressants qu'ils sont structurellement très proches des nAChRs des jonctions musculaires. Les récepteurs sérotoninergiques, quant à eux, exhibent une diversité beaucoup moins importante que la plupart des autres types de récepteurs pentamériques. La première sous-unité à avoir été découverte (5-HT_{3A}) est capable de générer des récepteurs homopentamériques mais elle peut aussi s'associer avec la sous-unité récemment découverte, 5-HT_{3B} (Davies et al., 1999), pour former des complexes hétéromériques. Les propriétés structurales et fonctionnelles des 5-HT₃Rs ressemblent à celles des nAChRs. Ils jouent un rôle essentiel dans la modulation de la motilité et de la sécrétion dans le système digestif. Les récepteurs GABA_A, activés par le

GABA, se caractérisent par une très grande diversité de leurs sous-unités qui se co-assemblent pour générer un nombre élevé de sous-types récepteurs GABA_A différents. Enfin, les récepteurs glycinergiques peuvent former des homomères, composés des cinq sous-unités α , ou des hétéropentamères, lorsque la sous-unité α est associée à la sous-unité β .

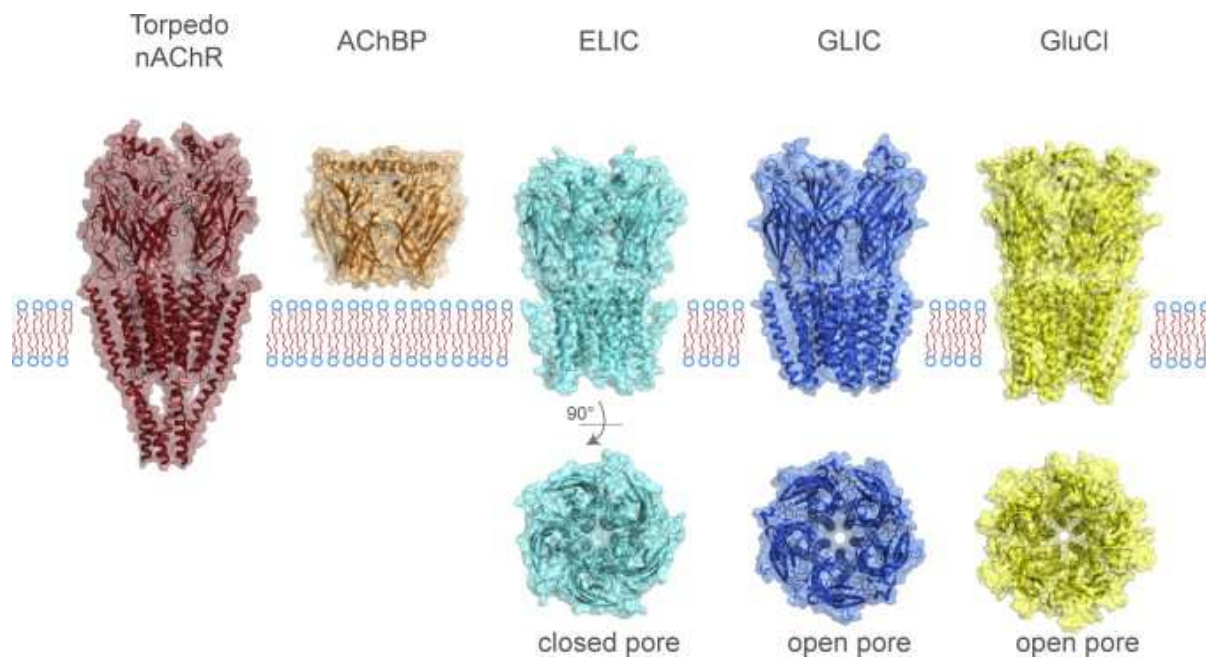


Figure 1.8. Structure de différents membres de la superfamille des récepteurs-canaux pentamériques. De gauche à droite : structure du nAChR *Torpedo marmorata* obtenue par microscopie électronique ; structure cristallographique de l'AChBP (pour "Achetylcholine-binding protein", protéine soluble), des récepteurs bactériens ELIC et GLIC, et du récepteur GluCl de *C. elegans*. D'après Nys et al., 2013

Tous les récepteurs pentamériques partagent une architecture structurale commune, avec cinq sous-unités arrangées pseudo-symétriquement, formant une rosette pentamérique (Fig. 1.8). Chaque sous-unité individuelle, qui comprend entre 430 et 530 acides-aminés, se divise en plusieurs domaines aux fonctions bien spécifiques : un large domaine extracellulaire (ECD) qui comprend le site de liaison de l'agoniste, à l'interface entre sous-unités, et qui est une cible majeure des modulateurs allostériques; le domaine transmembranaire (TMD) qui est constitué de quatre hélices transmembranaires (M1-M4) avec les segments M2 qui forment

les parois du pore du canal ionique et qui est aussi la cible de modulateurs allostériques tels que les alcools, les anesthésiants et les neurostéroïdes ; le domaine intracellulaire (ICD) qui se compose d'une large boucle intracellulaire formée par M3 et M4, et qui joue un rôle important dans le le transport du récepteur et sa modulation. En comparant les structures cristallographiques des récepteurs pentamériques procaryotes ELIC (*Erwinia chrysanthemi* pentameric ligand-gated ion channel) et GLIC (*Gloeobacter violaceus* pentameric ligand-gated ion channel) les chercheurs ont proposé un mécanisme d'activation général pour les récepteurs pentamériques, impliquant un mouvement de torsion et de déformation du récepteur (Bocquet et al., 2009, 2007 ; Hilf & Dutzler, 2008 ; Prevost et al., 2012). La liaison des agonistes aux interfaces entre sous-unités induit en effet une torsion ("twist") quaternaire de l'ECD qui conduit à des déformations de la structure tertiaire de chaque sous-unité (Fig. 1.9.). Ces déformations impliquent un réarrangement substantiel des interfaces entre sous-unités et un mouvement descendant de la boucle $\beta 1-\beta 2$. Ces mouvements sont apparemment couplés à une inclinaison des segments M2 et M3 et génèrent une large ouverture dans la partie supérieure du canal ionique (Corringer et al., 2012 ; Taly et al., 2009).

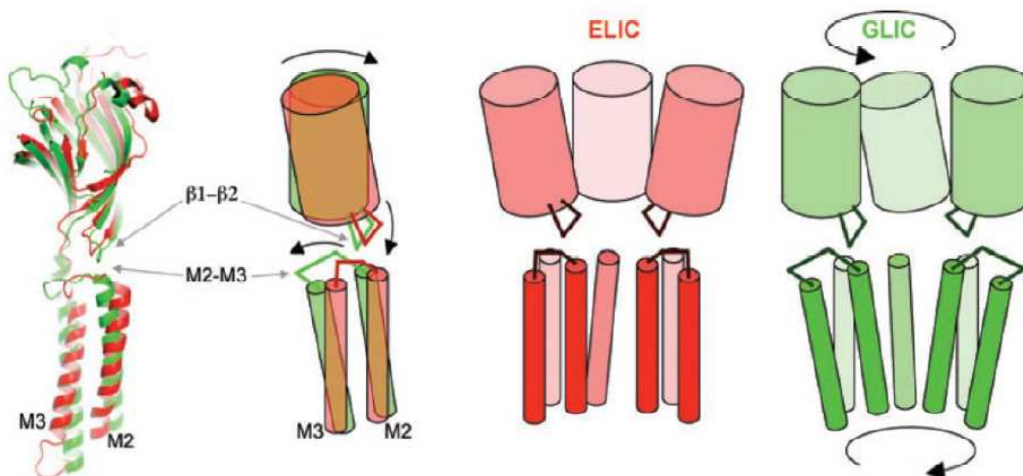


Figure 1.9. Mécanisme d'activation proposé pour les récepteurs-canaux pentamériques. A gauche : superposition des structures de GLIC (vert, état ouvert) et ELIC (rouge, état fermé) (une seule sous-unité est représentée). A côté sont représentés schématiquement les changements conformationnels qui interviennent lors de l'activation. De ELIC à GLIC, on peut observer un mouvement de rotation des domaines extracellulaires et un mouvement de torsion de l'ensemble du canal ionique. Le pore s'ouvre en réponse aux mouvements concertés du segment $\beta 1-\beta 2$ (vers le bas) et TM2-TM3 (vers l'extérieur). A droite : schéma montrant les changements conformationnels de trois sous-unités et notamment les mouvements de rotation des parties inférieures dans un sens et des parties extérieures dans l'autre. *D'après Corringer et al., 2010.*

Les liens entre structures et fonctions dans les récepteurs-canaux pentamériques ont été également caractérisés par l'étude de mutations naturelles présentes dans de nombreuses maladies dénommées canalopathies. Ces maladies impliquent les récepteurs pentamériques cationiques et anioniques. Par exemple, des mutations des récepteurs glycinergiques sont à l'origine de l'hyperexplexie (Shiang et al., 1995), des mutations des nAChRs du muscle entraînent des syndromes myasténiques congénitaux (Engel et al., 2003), et des mutations des récepteurs GABA_A et des nAChRs neuronaux sont associées à l'épilepsie (Steinlein et al., 1995, 2004). Par ailleurs, les myasthénies aiguës, des maladies neuromusculaires auto-immunes graves, sont dues à des anticorps dirigés contre les nAChRs musculaires. Les récepteurs pentamériques sont des cibles thérapeutiques majeures pour des anesthésiants, des anxiolytiques, des sédatifs (comme les benzodiazépines). Ainsi, beaucoup d'intérêt est apporté à l'étude des récepteurs pentamériques dans l'espoir de nouveaux traitements contre une large gamme de maladies neurologiques et psychiatriques (Lemoine et al. 2012 ; Taly et al., 2009).

2. RECEPTEURS DU GLUTAMATE

Le cerveau humain d'un adulte comprend plus de 10^{11} neurones (Azevedo et al., 2009). Chaque neurone peut contacter entre 10^3 et 10^4 autres neurones au travers des synapses électriques ou chimiques, jonctions fonctionnelles entre le neurite (classiquement un axone) d'un neurone et le neurite (usuellement un dendrite) d'un autre (Fig. 2.1 ; Katz, 1996). Le nombre de synapses dans notre cerveau est par conséquent gigantesque ($\sim 10^{15}$), et la moitié de ces synapses sont glutamatergiques. En effet, le glutamate agit comme le neurotransmetteur majeur des synapses excitatrices du système nerveux central (SNC) des mammifères. Le pouvoir excitateur du glutamate est connu depuis les années 1950 (Curtis & Wakins, 1960). Ce n'est pourtant qu'à la fin des années 1970 que le glutamate est accepté comme neurotransmetteur excitateur majeur dans le SNC. Les récepteurs du glutamate présents aux synapses glutamatergiques assurent la transduction du signal, entre le neurone pré-synaptique, qui libère le glutamate de façon transitoire, et le neurone post-synaptique. Ainsi, la liaison du glutamate sur son récepteur se traduit par des variations de l'excitabilité du neurone post-synaptique.

Le glutamate libéré par le bouton présynaptique diffuse dans la fente synaptique et active deux grandes classes de récepteurs : les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs), qui sont des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs), et les récepteurs-canaux ou récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), qui regroupent les récepteurs AMPA (rAMPAs), NMDA (rNMDAs) et Kainate (rKAs) (Dingledine et al., 1999 ; Niswender & Conn, 2010 ; Rondard et al., 2011) (Fig. 2.1). En particulier, les rAMPAs et rNMDAs, et dans une moindre mesure les rKAs, sont responsables des courants (ou potentiels) post-synaptiques excitateurs (PPSE), activés par le glutamate. Le glutamate, une fois libéré par les vésicules pré-synaptiques diffuse rapidement à travers la fente synaptique et se fixe sur les iGluRs regroupés à la membrane post-synaptique. Les canaux des iGluRs s'ouvrent alors, ce qui permet aux ions (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) de traverser la membrane post-synaptique. Dans les conditions physiologiques, lorsque les iGluRs sont activés, leur canal laisse passer principalement les ions sodium (parfois calcium), ce qui provoque une dépolarisation de la membrane du neurone post-synaptique et *in fine* l'initiation de potentiels d'action. Les iGluRs doivent agir très rapidement car le glutamate n'est présent que transitoirement dans la fente

synaptique (quelques millisecondes) avant d'être recapturé par les transporteurs du glutamate de la membrane pré-synaptique (EAATs).

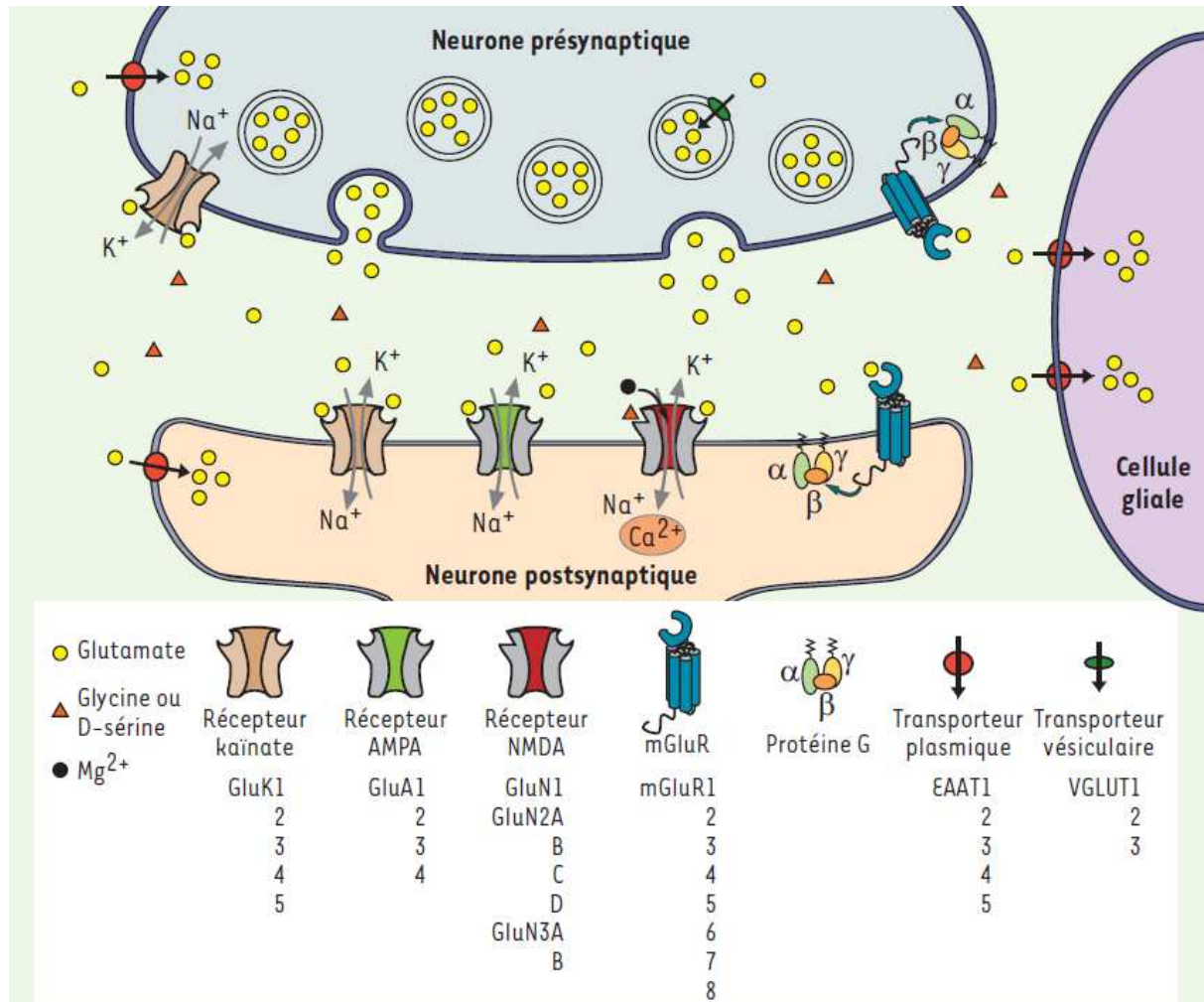


Figure 2.1. Représentation schématique d'une synapse glutamatergique. Pour chaque famille de récepteurs, les différentes sous-unités constitutives sont listées. *D'après Gielen, 2010*

2.1. Récepteurs métabotropiques du glutamate

Les mGluRs appartiennent à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G ("GTP-binding proteins"), et plus précisément à la classe III des RCPGs. Cette classe comprend aussi les récepteurs GABA_B, qui sont activés par l'acide γ -aminobutyrique (GABA), le principal neurotransmetteur inhibiteur dans le cerveau des vertébrés, le senseur calcique (CaSR), ainsi que certains récepteurs du goût et certains récepteurs aux phéromones (Bockaert & Pin, 1999 ; Pin et al., 2003).

L'existence des mGluRs a été mise en évidence tardivement, au milieu des années 80 (Watkins & Jane, 2006). Elle a été confirmée au début des années 1990 par la biologie moléculaire, avec le clonage de la sous-unité mGluR1 (Houamed & al., 1991), premier membre d'une famille de huit gènes (mGluR1-8) (Conn & Pin, 1997 ; Bockaert & Pin, 1999). Cette hétérogénéité moléculaire est renforcée par l'épissage alternatif chez les sous-unités mGluR1, mGluR4, mGluR5 (Iversen et al., 1994 ; Minakami et al., 1994 ; Pin et al., 1992 ; Tanabe et al., 1992). En fonction de leurs homologies de séquence et du type de signal de transduction qu'ils activent (Ohashi et al., 2002), les mGluRs ont été classés en trois groupes différents (Bonsi et al., 2005 ; Chu & Habkitz, 2000 ; Endoh, 2004) : les récepteurs mGluR1 et mGluR5 forment le groupe I, et activent la phospholipase C _{β} , ce qui provoque une augmentation de la concentration intracellulaire d'inositol-1-4-5-triphosphate (IP3). La fixation de ce second messager sur des récepteurs du réticulum endoplasmique induit alors la sortie d'ions Ca²⁺ de cet organite, et donc une augmentation de la concentration cytosolique en Ca²⁺ (Watkins & Jane, 2006). Les récepteurs des groupes II (mGluR2 et mGluR3) et III (mGluR4, 6, 7 et 8) inhibent quant à eux l'activité de l'adénylate-cyclase. Cette enzyme produisant l'AMP cyclique (AMPC) à partir d'ATP, une telle inhibition conduit à une diminution de la concentration cytosolique d'AMPC. L'AMPC permettant l'activation de la protéine kinase A (PKA), on en déduit que la phosphorylation des rAMPAs et rKAs par la PKA potentialise leur activité (Fig. 2.2).

Une caractéristique commune des mGluRs réside dans la relative lenteur de leur activation, qui s'effectue avec des temps caractéristiques supérieurs à ~ 50 ms (Attwell &

Gibb, 2005). En raison de cette lenteur d'action du glutamate sur les mGluRs, ces récepteurs ne peuvent répondre qu'à des expositions prolongées au glutamate, par exemple lors de libérations répétées dues à des trains de potentiels d'action pré-synaptiques (Attwell & Gibb, 2005). Ils sont alors responsables de modulations lentes des réponses synaptiques, et peuvent conduire à l'intégration de signaux temporellement dispersés (Batchelor & Garthwaite, 1997). Ainsi, iGluRs et mGluRs, présents à une même synapse, permettent au glutamate à la fois de déclencher des réponses synaptiques rapides (via les iGluRs) et réguler ou réajuster l'activité du neurone (via les mGluRs). Les mGluRs ayant essentiellement un rôle modulateur de la transmission synaptique, ces récepteurs sont des cibles thérapeutiques attractives.

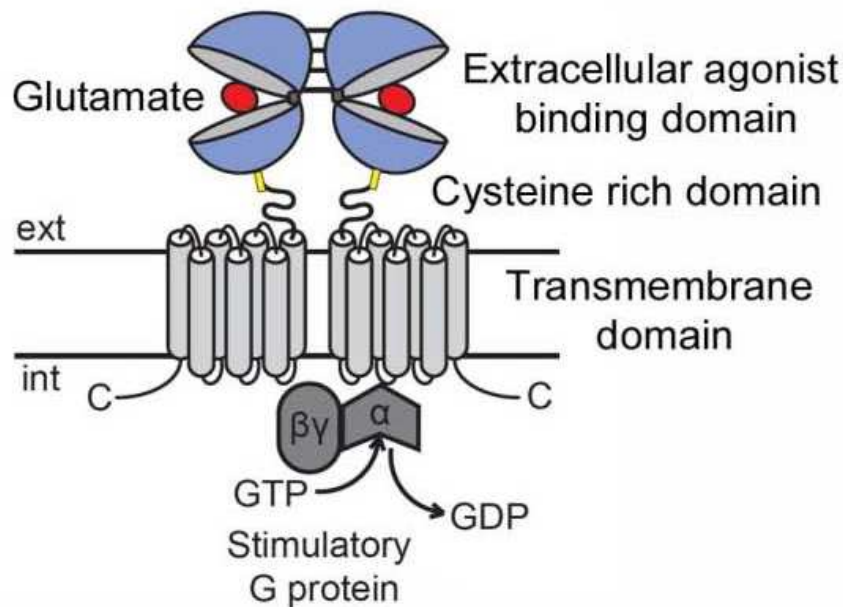


Figure 2.2. Topologie membranaire d'un récepteur métabotrope du glutamate. Représentation schématique d'un dimère de mGluR. Chaque monomère possède un large domaine extracellulaire de type-LIVBP, qui lie le glutamate, un domaine enrichi en cystéines, contenant 17 cystéines conservées, un domaine comprenant les sept segments transmembranaires et une queue C-terminale variable.

2.2. Récepteurs ionotropiques du glutamate (ou récepteurs-canaux)

2.2.1. Propriétés générales des récepteurs-canaux du glutamate

La deuxième superfamille de récepteurs du glutamate, celle des iGluRs a été initialement divisée en trois classes en fonction de leurs propriétés pharmacologiques (Fig. 2.3 ; Watkins & Jane, 2006). L'acide N-méthyl-D-aspartique ou NMDA (Watkins & Evans, 1981), active sélectivement une classe d'iGluRs appelés rNMDAs. Ces récepteurs sont bloqués spécifiquement par l'antagoniste D-AP5, mais pas par le CNQX ou NBQX, inhibiteurs des iGluRs de type non-NMDA. Ces derniers ont été subdivisés en deux familles de récepteurs : d'une part les rAMPA, sélectivement activés par le (S)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique ou AMPA, et d'autre part, les rKAs, sélectivement activés par l'acide kainique, issu de l'algue marine *Digenia simplex*. Cette hétérogénéité pharmacologique au sein des iGluRs est accompagnée d'une hétérogénéité moléculaire. Le clonage par expression fonctionnelle de la première sous-unité iGluR, celle d'un rAMPA (GluA1), par Hollmann et al. en 1989, a en effet ouvert la voie à l'identification par homologie d'un total de dix-huit sous-unités iGluR eucaryotes (Hollmann et al., 1989 ; Fig. 2.3) : les rAMPA codés par quatre gènes (GluA1-4), les rKAs codés par cinq gènes (GluK1-5), les rNMDAs codés par sept gènes (GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B) (Mayer, 2006) et les récepteurs delta (GluD1 et GluD2). Si les sous-unités au sein d'une même classe d'iGluRs partagent une forte identité de séquence (sauf pour les rNMDAs), l'identité de séquence entre classes différentes est nettement plus faible. Par exemple, les sous-unités des rAMPA partagent 54% d'identité de séquence entre elles, celles des rKAs 29%, mais l'ensemble des sous-unités de rAMPA et de rKA ne partagent que 17% d'identité. En outre, les récepteurs delta se différencient des autres iGluRs par le fait qu'ils ne forment pas de canaux fonctionnels et leur mode d'action est encore mal défini.

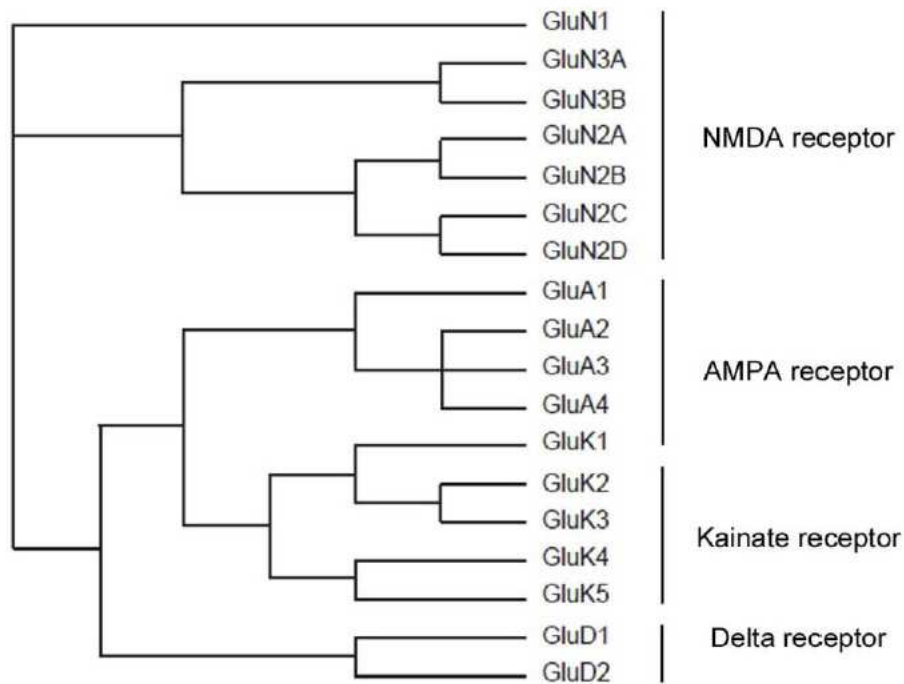


Figure 2.3. Arbre phylogénétique des différentes sous-unités des récepteurs-canaux du glutamate. *D'après Nishi et al., 2001*

Le profil d'expression et les modifications post-transcriptionnelles des ARNs des gènes iGluRs individuels sont fermement contrôlés selon leur localisation et le stade de développement, de telle sorte que dans le SNC embryonnaire et adulte, la composition des iGluRs en sous-unités est remarquablement différente. Alors que la plupart des iGluRs sont impliqués dans la transmission synaptique, on trouve également des récepteurs avec des propriétés de signalisation et des perméabilités calciques distinctes, qui jouent un rôle dans le contrôle de la formation des synapses et du développement des circuits nerveux dans l'embryon. En outre, les cellules gliales expriment aussi une variété d'iGluRs (Burnashev et al., 1992a ; Patneau et al., 1994). Elles ont été particulièrement bien étudiées dans les cellules précurseur des oligodendrocytes, présentes dans le nerf optique et le cervelet (Zonouzi et al., 2011), mais il reste beaucoup à apprendre sur les rôles de ces récepteurs dans d'autres cellules gliales et d'autres régions de cerveau.

Comparés aux mGluRs, les iGluRs post-synaptiques sont responsables de la transmission synaptique excitatrice rapide (Fig. 2.4.). En effet, leurs cinétiques d'activation sont assez rapides pour répondre à une libération brève de glutamate dans la fente synaptique, par exemple lors d'une fusion vésiculaire unique. Dans ce cas, les quelques milliers de molécules de glutamate contenues dans une vésicule donnent lieu, en à peine quelques microsecondes, à un pic de concentration de ~ 1 mM sous le site de libération. Toutefois, cette concentration n'est atteinte que très transitoirement : en effet, le glutamate diffuse rapidement hors de la fente synaptique, avec un temps caractéristique de ~ 1 ms (Attwell & Gibb, 2005). Ainsi, après 3 ms, la concentration de glutamate diminue de trois ordres de grandeur sous le point de libération (Barbour & Hausser, 1997; Barbour, 2001). Enfin, bien qu'il y ait aussi des preuves de la présence d'iGluRs sur les boutons pré-synaptiques (Schmitz et al., 2001 ; Pinheiro & Mulle, 2008) et que leurs effets sur la libération vésiculaire de neurotransmetteurs soient bien documentés, les iGluRs pré-synaptiques sont moins caractérisés d'un point de vue fonctionnel.

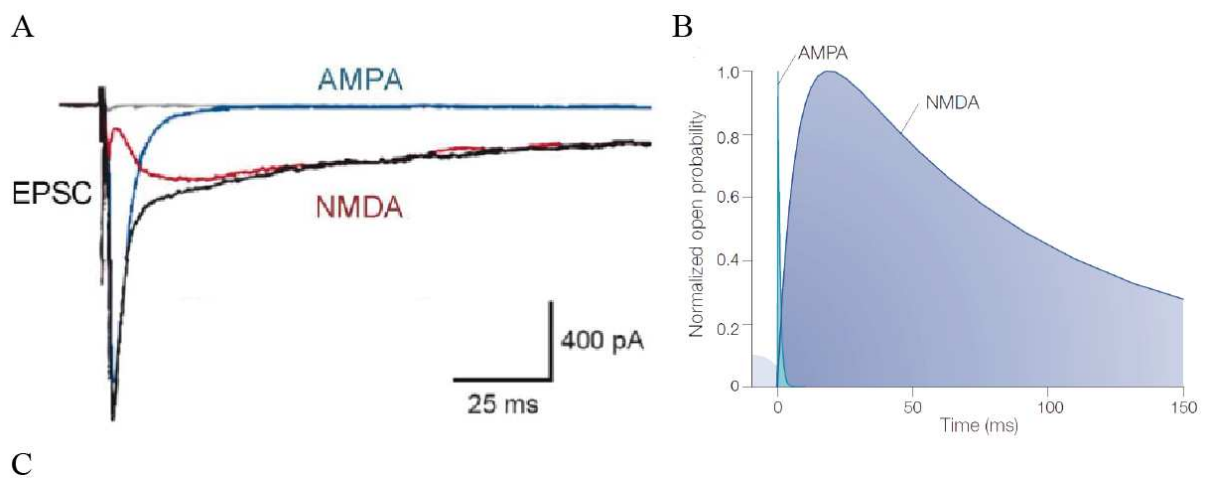


Table 1 | **Kinetic properties of AMPA and NMDA receptors at room temperature**

Receptor	k_{on}	k_{off}	k_{off}/k_{on}	Steady-state EC_{50}	Weighted τ_{decay}
AMPA	$4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	$2,000 \text{ s}^{-1}$	0.5 mM	46 μM	0.84 ms
NMDA	$5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$	5 s^{-1}	1 μM	0.6 μM	150 ms

AMPA, α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate. k_{on} and k_{off} are the rate constants for glutamate binding and unbinding (k_1 and k_{-1} in the schemes of FIG. 3); steady-state EC_{50} is the glutamate concentration that activates a half-maximal steady-state current; weighted τ_{decay} (the mean of the time constants of each exponential decay component weighted by their amplitudes) was calculated from the kinetic schemes in FIG. 3a and FIG. 3b for a brief pulse of glutamate.

Figure 2.4. Propriétés cinétiques des récepteurs-canaux du glutamate. **A.** Représentation des deux composantes du courant post-synaptique excitateur. EPSCs enregistrés sur un neurone hippocampal de rat en conditions contrôles (trace noire), en présence de 50 μM de D-AP5 (inhibiteur compétitif des rNMDAs, trace bleue), en présence de 5 μM de CNQX (inhibiteur compétitif des rAMPAs, trace rouge) et en présence de D-AP5 et CNQX (trace grise). Les courants sont mesurés à -60 mV, en absence de magnésium dans le milieu extracellulaire (*D'après Tong et Jahr, 1994*). **B.** Cinétique d'activation des rAMPAs et rNMDAs en réponse à une application de 0,3 ms de glutamate à 1 mM (réponse qui vise à mimer la présence transitoire de glutamate dans la fente synaptique lors de l'activité synaptique). **Po**, probabilité d'ouverture normalisée par rapport à la valeur maximale. (*D'après Attwell et Gibb, 2005*). **C.** Différents paramètres des propriétés cinétiques des rAMPAs et rNMDAs. (*D'après Attwell & Gibb, 2005*).

Si tous les iGluRs peuvent être activés par des applications brèves de glutamate, ils présentent néanmoins des propriétés cinétiques distinctes (Fig. 2.4.C ; Erreger et al., 2004). Ainsi, à une synapse excitatrice typique, deux composantes principales peuvent être mises en évidence dans le courant postsynaptique excitateur : une composante rapide et une composante lente, portées respectivement par les rAMPAs et rNMDAs (Fig. 2.4.A et B ; Tong et Jahr, 1994). Les rAMPAs, de même que les rKAs, s'activent et s'inactivent (processus de désactivation) avec des temps caractéristiques inférieurs à la milliseconde (Fig. 2.4.B ; Erreger et al., 2004). Ces propriétés leur permettent d'effectuer un codage rapide de l'information (fréquence supérieure à 100 Hz), c'est-à-dire de suivre des trains de potentiels d'action (Attwell & Gibb, 2005) qui donnent lieu à des libérations de glutamate séparées par des temps de l'ordre de 10 ms. A contrario, les rNMDAs présentent des cinétiques plus lentes (Fig. 2.4). Il leur faut une dizaine de millisecondes pour être pleinement activés après la liaison du glutamate. Par ailleurs, ils s'inactivent sur des échelles de temps de dizaines voire centaines de millisecondes. Cette lenteur reflète un temps de résidence élevé du glutamate sur les rNMDAs et leur permet de jouer le rôle de détecteur de coïncidence entre excitation des éléments pre- et post-synaptiques. En effet, après libération vésiculaire, le glutamate peut se lier au rNMDA, mais le blocage de ce dernier par le Mg^{2+} empêche tout flux ionique au potentiel électrique de repos des neurones qui est négatif (Dingledine et al., 1999). Cette inhibition dépend en effet du potentiel membranaire: lorsque celui-ci devient positif, le Mg^{2+} se dissocie du canal. Les ions perméants peuvent alors transiter au travers de leur canal ionique. La forte perméabilité calcique des rNMDAs provoque alors un influx de Ca^{2+} permettant l'initiation de diverses formes de plasticité essentielles aux phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Bliss & Collingridge, 1993). Dans un tel schéma, une

dissociation lente du glutamate est nécessaire. L'affinité du rNMDA pour le glutamate est d'ailleurs très élevée ($EC_{50} \sim 1 \mu M$), près de cent fois plus importante que les rAMPAs ($EC_{50} \sim 100 \mu M$) (Attwell & Gibb, 2005).

Les propriétés cinétiques des rNMDAs varient selon la sous-unité GluN2 incorporée (voir Fig. **2.9.A** ; Erreger et al., 2004). Ainsi, les récepteurs GluN1/GluN2A se désactivent avec un temps caractéristique d'environ 40 ms, contre 2 s pour les récepteurs GluN1/GluN2D, les sous-unités GluN2B et GluN2C conférant une vitesse de dissociation du glutamate intermédiaire ($\tau_{off} \sim 300$ ms ; Vicini et al., 1998; Erreger et al., 2004). Ces cinétiques distinctes confèrent aux divers sous-types de rNMDAs des propriétés de transfert de charge très différentes. Ainsi, malgré leur probabilité d'ouverture maximale ($P_o \sim 0.1-0.2$), largement inférieure à celle des récepteurs GluN1/GluN2A ($P_o \sim 0.4-0.5$) les récepteurs GluN1/GluN2B transfèrent une charge unitaire deux fois supérieure à celle transférée par les récepteurs GluN1/GluN2A. Par conséquent, à des fréquences de stimulation faibles, inférieures à 1 Hz (typiquement utilisée pour induire la LTD), les récepteurs GluN1/GluN2B portent une charge plus importante que les récepteurs GluN1/GluN2A (Erreger et al., 2005). Etant donné que les perméabilités calciques de ces deux types de rNMDAs sont égales (Schneppenburger, 1996), les récepteurs ayant incorporé la sous-unité GluN2B laissent entrer une quantité de calcium plus importante à faible fréquence de stimulation. Par contre, des fréquences de stimulation élevées ne laissent à aucun rNMDA le temps de dissocier le glutamate, et ne discriminent donc pas les différents sous-types en fonction de leur vitesse de désactivation mais en fonction de leur probabilité d'ouverture maximale (Erreger et al., 2005).

2.2.2. Récepteurs AMPA

Les rAMPA sont les acteurs majeurs de la transmission glutamatergique rapide dans le SNC (Attwell & Gibb, 2005 ; Traynelis et al., 2010). Perméables aux cations monovalents Na^+ et K^+ (avec des perméabilités comparables pour les deux cations), les rAMPA ont un potentiel d'inversion proche de 0 mV, comme les autres iGluRs (Jahr & Stevens, 1987). La plupart des rAMPA sont des hétérotétramères, formés par l'assemblage symétrique de deux dimères, qui associent généralement deux sous-unités GluA2 à deux sous-unités GluA1, GluA3 ou, plus rarement, GluA4 (Greger et al., 2007 ; Mayer, 2005).

Les quatre sous-unités GluA sont soumises à l'épissage et à l'édition de leur ARN (Dingledine et al., 1999 ; Greger et al., 2003 ; Penn & Greger, 2009). Il existe quatre modifications majeures : l'épissage alternatif nommé flip/flop et présent dans les quatre sous-unités, l'épissage alternatif en C-terminal qui concerne GluA2 et GluA4, l'édition Q/R uniquement dans la sous-unité GluA2, et l'édition R/G dans les sous-unités GluA2, GluA3 et GluA4 (Seeburg et al., 1998). Ces modifications post-traductionnelles augmentent considérablement la diversité fonctionnelle des rAMPA. L'isomérisation entre les formes flip et flop est due à un segment variable de 38 acides-aminés (Sommer et al., 1990) dont l'identité contrôle diverses caractéristiques biophysiques du récepteur. Les études portant sur la désensibilisation des rAMPA (voir Introduction **2.2.8**), ont montré que les récepteurs ayant incorporé le variant « flop » désensibilisaient plus rapidement que les récepteurs ayant le variant « flip » (Mosbacher et al., 1994). Les distributions spatiales et temporelles de l'expression de ces deux isoformes sont différentes (Lambolez et al., 1992 ; Monyer et al., 1991 ; Sommer et al., 1990). Un autre épissage alternatif, en C-terminal, se rencontre dans les sous-unités GluA2 et GluA4 (Gallo et al., 1992 ; Kohler et al., 1994) et donne lieu à des queues C-terminales de taille variable, les formes les plus longues présentant à leur extrémité des séquences de liaison à certains PDZ. Les protéines contenant ces domaines ont un rôle primordial dans l'ancrage des récepteurs à la densité post-synaptique, ce qui rend l'épissage critique pour le contrôle du trafic des rAMPA à la synapse (Bredt & Nicoll, 2003).

Par ailleurs, l'ARN de la sous-unité GluA2 contient une glutamine, résidu neutre, qui peut être éditée en arginine, résidu chargé positivement. Le site Q/R (appelé Q/R/N car le résidu homologue, dans les rNMDAs, est une asparagine) occupe une position stratégique dans la lumière du canal ionique, d'où il contrôle notamment la sélectivité calcique : de par sa charge positive, l'arginine constitue une barrière électrostatique aux ions divalents Ca^{2+} . Les récepteurs ayant incorporé la sous-unité GluA2 sont donc imperméables au calcium (Hume et al., 1991 ; Burnashuev et al., 1992b ; Hollmann et al., 1991). Etant donné que la majorité des rAMPAs chez l'adulte contient la sous-unité GluA2, à l'exception notable de ceux présents dans certains interneurons GABAergiques (Goldberg et al., 2003), les rAMPAs ne laissent généralement pas passer les ions calciques, et permettent donc de limiter l'excitotoxicité induite par un excès de Ca^{2+} (Hume et al., 1991 ; Greger et al., 2003 ; Isaac et al., 2007). De plus, l'arginine induit aussi une gêne électrostatique pour les cations monovalents K^+ et Na^+ , ce qui a pour effet de diminuer fortement la conductance unitaire. Un deuxième site d'édition, le site R/G concerne les sous-unités GluA2-4. Cette édition, qui a lieu au sein du domaine de liaison de l'agoniste, intervient dans environ 50 % des rAMPAs du cerveau humain. Cette édition influence les cinétiques d'activation et la dimérisation entre sous-unités (Greger et al., 2006 ; Lomeli et al., 1994 ; Seeburg, 1996).

Une fois le récepteur formé, les extrémités C-terminales des rAMPAs sont soumises à diverses modifications post-traductionnelles. On dénombre ainsi plusieurs sites de phosphorylation, par les protéines kinases PKA, PKC et la CaMKII (Blackstone et al., 1994 ; Tan et al., 1994), de glycosylation (Everts et al., 1997), de palmitoylation, d'ubiquitination, ainsi que des interactions avec les protéines d'échafaudage (Roche et al., 1996 ; Anggono & Huganir, 2012 ; Henley et al., 2011 ; Shepherd & Huganir, 2007). Ces modifications des domaines C-terminaux sont essentielles à la régulation de l'activité du récepteur, son transport à la membrane, sa stabilisation à la synapse et son activation.

Les rAMPAs sont concentrés majoritairement sur la membrane post-synaptique, au niveau des épines dendritiques (Craig et al., 1993). Selon les synapses, ils sont plutôt distribués de manière homogène sous le site de libération du glutamate (Masugi-Tokita et al., 2007), ou localisés à la périphérie de la synapse (Matsubara et al., 1996 ; Masugi-Tokita et al., 2007). On trouve également des rAMPAs extra-synaptiques (Nusser et al., 1998) et pré-

synaptiques (Matsubara et al., 1996 ; Schenk et al., 2003). Les rAMPA extra-synaptiques diffusent librement dans la membrane plasmique, mais perdent leur mobilité une fois à la synapse. Ils formeraient ainsi un « réservoir » de rAMPA postsynaptiques (Borgdorff & Choquet, 2002) (Fig 2.5). En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les rAMPA postsynaptiques désensibilisés pouvaient être remplacés rapidement (en quelques dizaines de millisecondes) par des récepteurs extra-synaptiques (Heine et al., 2008). Ce mécanisme permet d'expliquer, en partie, comment la transmission glutamatergique peut être récupérée après une dépression synaptique rapide. Enfin, les rAMPA pré-synaptiques jouent un rôle dans la modulation de la libération de neurotransmetteurs (Lee et al., 2002 ; Pinheiro & Mulle, 2008). Par exemple, aux synapses entre les cellules en panier et les cellules de Purkinje, les rAMPA pré-synaptiques sont activés par le glutamate libéré par les fibres parallèles voisines (phénomène de « spill-over ») et diminuent la libération de GABA. Ces rAMPA pré-synaptiques auraient en outre une action de type métabotrope, en activant des cascades intracellulaires indépendamment de tout flux ionique (Schenk & Matteoli, 2004).

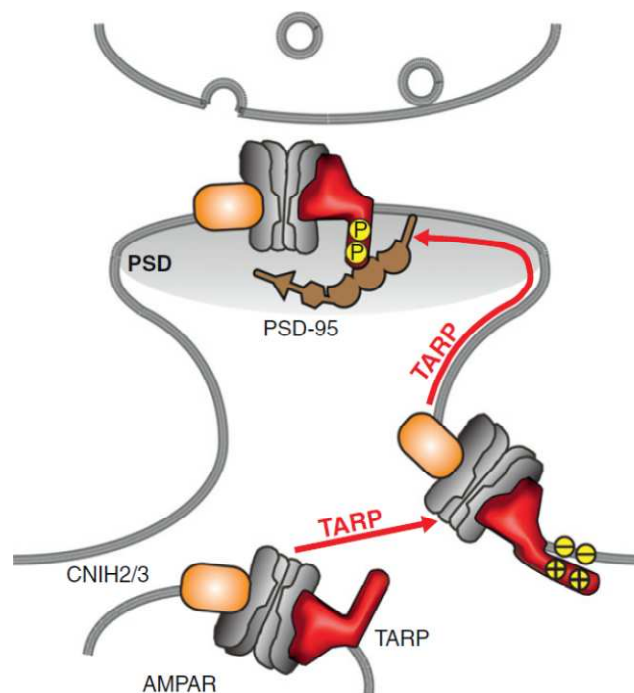


Figure 2.5. Les récepteurs AMPA s'associent avec les protéines CNIH et TARP. Les TARPs sont impliqués dans l'expression surfacique et la localisation synaptique des rAMPA. Les rAMPA sont stabilisés à la synapse via des interactions entre les domaines PDZ de la protéine TARP (une fois phosphorylée) et de la protéine PSD-95. *De Straub & Tomita., 2012*

L'activité des rAMPAs est également modulée par des protéines intégrales de membrane, appelées protéines auxiliaires, avec lesquelles ils interagissent (Sumioka, 2013 ; Nicoll et al., 2006). Parmi ces protéines auxiliaires, les protéine TARPs (Transmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins), dont la stargazine (aussi connue sous le nom de TARP $\gamma 2$), sont les plus étudiées (Fig. 2.5). Des immunoprécipitations d'extraits de cerveaux ont montré que les TARPs interagissaient de façon robuste et exclusive avec les sous-unités de rAMPA (Fukata et al., 2005 ; Tomita et al., 2003 ; Tomita et al., 2004). La liaison de la protéine TARP change les propriétés cinétiques des rAMPAs. On observe par exemple une augmentation de l'affinité apparente pour le glutamate (Priel et al., 2005 ; Tomita et al., 2005), une augmentation du plateau à saturation et un ralentissement des cinétiques de désensibilisation et de désactivation (Priel et al., 2005 ; Tomita et al., 2005 ; Turetsky et al., 2005), qui s'accompagnent d'une augmentation de la conductance unitaire (Tomita et al., 2005). Des travaux récents, combinés à un criblage protéomique ont montré que vingt et une autres protéines, essentiellement transmembranaires, pouvaient lier les rAMPAs à la synapse formant ainsi des complexes macromoléculaires massifs (jusqu'à 1 million de Dalton ; Schwenk et al., 2012).

2.2.3. Récepteurs kainate

Les récepteurs kainate (rKAs) sont exprimés de façon ubiquitaire dans le SNC. Bien qu'ils soient relativement peu impliqués dans la signalisation excitatrice post-synaptique rapide *per se* (ne contribuant pas ou peu au PPSE), les rKAs jouent un rôle important dans le contrôle de l'activité des circuits neuronaux, et le développement des synapses (Contractor et al., 2011 ; Copits & Swanson, 2012 ; Sihra et al., 2013). Chez les humains, les rKAs ont été mis en cause dans un certain nombre de pathologies neurologiques, notamment les douleurs chroniques, l'épilepsie et les migraines (Jane et al., 2009).

Les rKAs sont codés par cinq gènes appartenant à deux sous-familles distinctes, GluK1-3 (anciennement GluR5-7) et GluK4-5 (anciennement KA1-2). Clonée au début des

années 90, GluK1 présente ~40 % d'homologie avec les sous-unités des rAMPA (Bettler et al., 1990). Par la suite seront clonés GluK2 et GluK3, aux propriétés pharmacologiques et biophysiques proches de celles de GluK1 (Bettler et al., 1992 ; Egebjerg et al., 1991), puis GluK4 et GluK5, caractérisées par leur haute affinité pour le glutamate. De manière générale, leurs propriétés fonctionnelles sont assez semblables à celles des rAMPA (activation et désensibilisation rapides) (Fig. 2.6). Les sous-unités GluK1-3 peuvent former des récepteurs homomériques ou hétéromériques, alors que les sous-unités GluK4-5, ne forment des canaux fonctionnels qu'en association hétéromérique avec au moins un type de sous-unité GluK1-3 (Werner et al., 1991; Copits & Swanson, 2012 ; Perrais et al., 2009).

De même que pour les rAMPA, les propriétés biophysiques de base des rKAs sont en partie déterminées par l'épissage alternatif et l'édition de leurs ARNs, notamment l'épissage de l'extrémité C-terminale des sous-unités GluK1-3, similaire à celui des sous-unités de rAMPA (Sommer et al., 1990 ; Schiffer et al., 1997). Cet épissage jouerait un rôle dans les diverses interactions entre les rKAs et des protéines intracellulaires impliquées dans l'adressage et l'ancrage des récepteurs à la membrane plasmique (Schiffer et al., 1997). En outre, les sous-unités GluK1 et GluK2 sont sujettes à l'édition de leur ARN, au niveau du site Q/R (sur la « p-loop » ou segment M2 du canal ionique). L'arginine présente dans les sous-unités éditées contrôle la perméabilité aux cations (Burnashev, 1996 ; Kohler et al., 1993). Néanmoins, contrairement à la sous-unité GluA2, cette édition n'est pas systématique mais sujette à des régulations temporelles et spatiales (Bernard & Khrestchatisky, 1994; Grigorenko et al., 1998). Les rKAs ayant incorporé les sous-unités éditées sont peu perméables aux ions Ca^{2+} et se caractérisent par une faible conductance unitaire (Egebjerg & Heinemann, 1993 ; Swanson et al., 1996). Il est à noter que deux autres sites d'édition, les sites I/V et Y/C, localisés sur le segment transmembranaire TM1, ajoutent encore à la diversité des rKAs. En conclusion, la perméabilité calcique des canaux des rKAs est variable, et dépend de l'édition à la fois des segments M1 et M2 (Kohler et al., 1993 ; Traynelis & Wahl, 1997). Les rKAs peuvent aussi être phosphorylés par la PKA, ce qui les potentialise, et déphosphorylés par la calcineurine, ce qui les inhibe. Ces modulations reflètent les changements de P_o des récepteurs (Traynelis & Wahl, 1997). Enfin, l'état de glycosylation de ces récepteurs semble contrôler leur expression ainsi que leurs propriétés fonctionnelles (Everts et al., 1997).

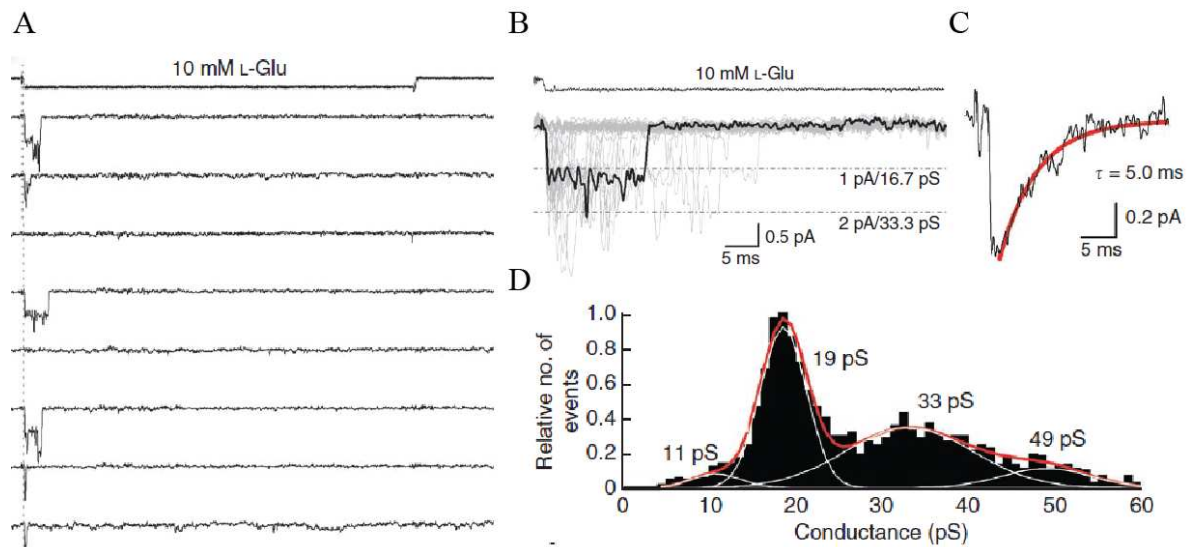


Figure 2.6. Propriétés biophysiques des récepteurs kainate. **A-** Enregistrement de courants unitaires induits par la liaison de glutamate, en configuration « outside-out ». La somme de 45 d'entre eux est représentée en **B**. **C-** Courant individuel moyen montrant la réponse des rKA-GluK2 à une application longue de glutamate et leur désensibilisation quasi totale. **D-** Distributions des conductances unitaires du rKA-GluK2. *De Dawe et al., 2013.*

En fonction de leur composition en sous-unités et des modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles de leurs sous-unités, les rKAs sont présents plutôt sur la membrane pré-synaptique ou la membrane post-synaptique (Jaskolski et al., 2005). Cependant, comme mentionné plus haut, la contribution des rKAs au courant post-synaptique excitateur (EPSC), si elle existe bien (Vignes & Collingridge, 1997; Mulle et al., 1998), est généralement bien plus faible que celle des rAMPAs. Ainsi, les rKAs, dont la localisation est plutôt pré-synaptique, ont surtout un rôle de modulateur de l'activité synaptique, notamment en régulant la libération de glutamate. En effet, leur activation, en dépolarisant la terminaison axonale, induit une entrée de calcium via les canaux calciques activés par le potentiel (qui sont responsables de la fusion vésiculaire), ce qui favorise la libération synaptique de glutamate (Frerking et al., 2001). Au contraire, certains rKAs pré-synaptiques possédant une activité métabotrope peuvent inhiber la libération vésiculaire (Rozas et al., 2003). Enfin, il a été proposé que certains rKAs post-synaptiques contenant la sous-unité GluK2 pourraient aussi jouer un rôle de type métabotrope, en augmentant l'excitabilité de la membrane post-synaptique (Ruiz et al., 2005; Rodriguez-Moreno & Sihra, 2007).

2.2.4. Récepteurs delta

La famille des récepteurs delta se décompose en deux groupes, les récepteurs $\delta 1$ ou GluD1 et $\delta 2$ ou GluD2 (Schmid & Hollmann, 2008), qui présentent une homologie faible, environ 25 %, avec les trois autres familles d'iGluRs (Yamazaki et al., 1992 ; Lomeli et al., 1993). La sous-unité GluD1, peu étudiée, est exprimée de façon transitoire dans plusieurs régions du SNC, au début du développement (Lomeli et al., 1993). Elle est fortement exprimée dans les cellules ciliées des systèmes auditifs et vestibulaires du cerveau adulte de souris (Safieddine & Wenthold, 1997).

On surnomme ces récepteurs les récepteurs orphelins (« orphans receptors ») car ils ne forment pas de canal ionique activé par le glutamate et on ne connaissait jusqu'à présent aucun ligand capable d'activer ces récepteurs. Récemment, la D-serine a été découverte comme ligand endogène de GluD2. En effet, les structures cristallographiques des domaines agonistes de GluD2 dans leur forme apo et en complexe avec la D-sérine ont permis d'identifier la poche de liaison de la D-sérine sur l'ABD de GluD2 et les changements structuraux causés par cette liaison. Néanmoins, aucun courant n'a pu être détecté lorsque la D-sérine ou la glycine (1 mM) est appliquée sur des ovocytes injectés avec l'ADNc codant pour le récepteur GluD2 de type sauvage (Naur et al., 2007). Les ABDs des récepteurs delta semblent jouer un rôle important dans le phénotype silencieux de ces récepteurs car des chimères obtenues en remplaçant l'ABD de GluD2 par ceux des rAMPA ou rKAs forment des canaux ioniques fonctionnels, activés par le glutamate (Schmid et al., 2009).

La caractérisation de GluD2 la plus aboutie provient de l'étude des mutants *Lurcher*. La mutation *Lurcher* correspond à la substitution d'une alanine par une thréonine dans le motif très conservé de la région transmembranaire M3 -SYTANLAA₆₅₄F. Il s'agit d'une mutation spontanée et à dominance incomplète, causant des déficits neurologiques et qui touche spécifiquement les sous-unités GluD2 (Zuo et al., 1997). Les souris hétérozygotes pour cette mutation (*Lurcher +/-*) sont ataxiques, suite à la mort sélective par apoptose des cellules de Purkinje du cervelet pendant le développement post-natal (Kashiwabuchi et al., 1995). Les souris homozygotes pour ce gène (*Lurcher -/-*) meurent peu après la naissance à cause d'une

perte massive de certains neurones dans le mésencéphale et le cerveau postérieur, pendant l'embryogenèse (Cheng & Heintz, 1997). En fait, cette mutation induit de forts courants de fuite Na^+ et Ca^{2+} dans les cellules de Purkinje, menant à la mort de ces cellules par excitotoxicité (Zuo et al., 1997). Ces récepteurs constitutivement actifs ("piégés" en conformation ouverte) possèdent des propriétés de perméabilité semblables à celles des autres iGluRs (Kohda et al., 2000). Par ailleurs, l'étude en système recombinant des récepteurs GluD2 ayant incorporé la mutation Lurcher a permis d'établir que la D-sérine, en plus de se lier à ces récepteurs, les inhibe en les faisant entrer dans un état de type désensibilisé (Naur et al., 2007; Hansen et al., 2009). La sous-unité GluD2, exprimée principalement dans les épines dendritiques des cellules de Purkinje, joue donc un rôle primordial dans l'organisation et le fonctionnement du cervelet. Elle est aussi impliquée dans les processus de synaptogenèse, de plasticité synaptique et de coordination motrice (Lomeli et al., 1993 ; Williams et al., 2003). Récemment, il a été montré que la D-serine agissait comme ligand endogène de GluD2 pour réguler la LTD ("Long-Term Depression") aux synapses entre les fibres parallèles et les cellules de Purkinje, dans le cervelet immature (Kakegawa et al., 2011).

Des études récentes ont apporté des informations concernant le mécanisme d'action de GluD2 dans le cervelet. Ainsi, il a été montré par des expériences combinant immunocytochimie, électrophysiologie et microscopie électronique par cryo-fracture, que la sous-unité GluD2 et la protéine soluble Cbln1, sécrétée par les cellules granulaires du cervelet, participaient à une même voie de signalisation, essentielle à la formation des synapses dans le cervelet. Plus précisément, la protéine Cbln1 lie directement le domaine N-terminal de GluD2 dans les cellules de Purkinje (Matsuda et al., 2010). Le complexe Cbln1-GluD2 joue un rôle primordial dans la formation des synapses entre les cellules granulaires et les cellules de Purkinje, car il régule la différenciation pré-synaptique et favorise l'apparition de « clusters » de molécules spécifiques de la synapse. Malgré ces avancées récentes, il reste beaucoup à découvrir sur les récepteurs delta, notamment concernant leurs propriétés biophysiques et les mécanismes par lesquels ils participent aux fonctions neuronales.

2.2.5. Récepteurs NMDA

Le premier ADNc d'une sous-unité de rNMDA, celui de GluN1, a été isolé par clonage fonctionnel dans des ovocytes de *Xénope* au début des années 90 (Moriyoshi et al., 1991). Le clonage ultérieur des autres sous-unités de rNMDA, a alors révélé leur importante diversité dans le SNC. Trois familles de sous-unités ont été identifiées (Moriyoshi et al., 1991 ; Monyer et al., 1992 ; Mori & Mishina, 1995) : GluN1, GluN2, avec quatre membres (GluN2A-D) et plus récemment GluN3, avec deux membres (GluN3A-B), soit sept gènes au total pour coder l'ensemble des rNMDAs (Fig. 2.7.A ; Matsuda et al., 2002 ; Sugihara et al., 1992). Il est maintenant clairement établi que les rNMDAs forment des assemblées hétéro-tétramériques, associant le plus souvent deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004 ; Paoletti & Neyton, 2007 ; Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013). Les rNMDAs incorporant les sous-unités GluN3 forment des complexes soit dihéromériques (GluN1/GluN3) soit trihéromériques (GluN1/GluN2/GluN3) (Traynelis et al., 2010 ; Paoletti et al., 2013). L'existence d'un tel répertoire de sous-unités permet de nombreuses combinaisons au sein d'un complexe récepteur tétramérique et est à l'origine, dans le SNC de multiples populations de rNMDAs fonctionnellement distinctes (Fig. 2.7.C).

2.2.5.1 Diversité moléculaire et distribution des sous-unités

La sous-unité GluN1 est encodée par un gène unique dont il existe huit variants d'épissage (GluN1-1a à 4a et GluN1-1b à 4b), qui concernent trois exons : l'exon 5, codant pour un segment extracellulaire de 21 acides-aminés dans le NTD (appelée "cassette N1") et deux exons adjacents, l'exon 21 et l'exon 22, qui encodent des séquences de respectivement 37 et 38 acides-aminés dans le CTD (cassettes C1 et C2) (Fig. 2.7.A ; Dingledine et al., 1999 ; Paoletti et al., 2013). La cassette N1, riche en résidus basiques affecte les propriétés fonctionnelles du récepteur, notamment l'affinité du récepteur pour les agonistes, leur sensibilité au zinc et au proton (Hollman et al., 1993 ; Paoletti et al., 1997 ; Traynelis et al., 1995, 1998 ; Vance et al., 2011). Cette cassette mimerait aussi l'action de la spermine

(Durand et al., 1993 ; Masuko et al., 1999). L'isoforme GluN1-1a, qui ne contient pas cette cassette (par opposition à l'isoforme "b"), est utilisée très majoritairement pour les études sur les récepteurs recombinants. La famille GluN2 est composée de quatre membres (GluN2A-D) encodés par quatre gènes différents, tandis que la famille GluN3 n'en contient que deux encodés par deux gènes distincts (GluN3A et GluN3B). Les sous-unités rNMDAs sont les plus longues de toutes parmi les iGluRs puisqu'elles comptent entre 900 et 1500 acides aminés, GluN1 étant la plus courte et GluN2B la plus longue. Cette variabilité dans les tailles des sous-unités iGluRs provient essentiellement d'une différence dans la longueur de leur queue C-terminale intracellulaire.

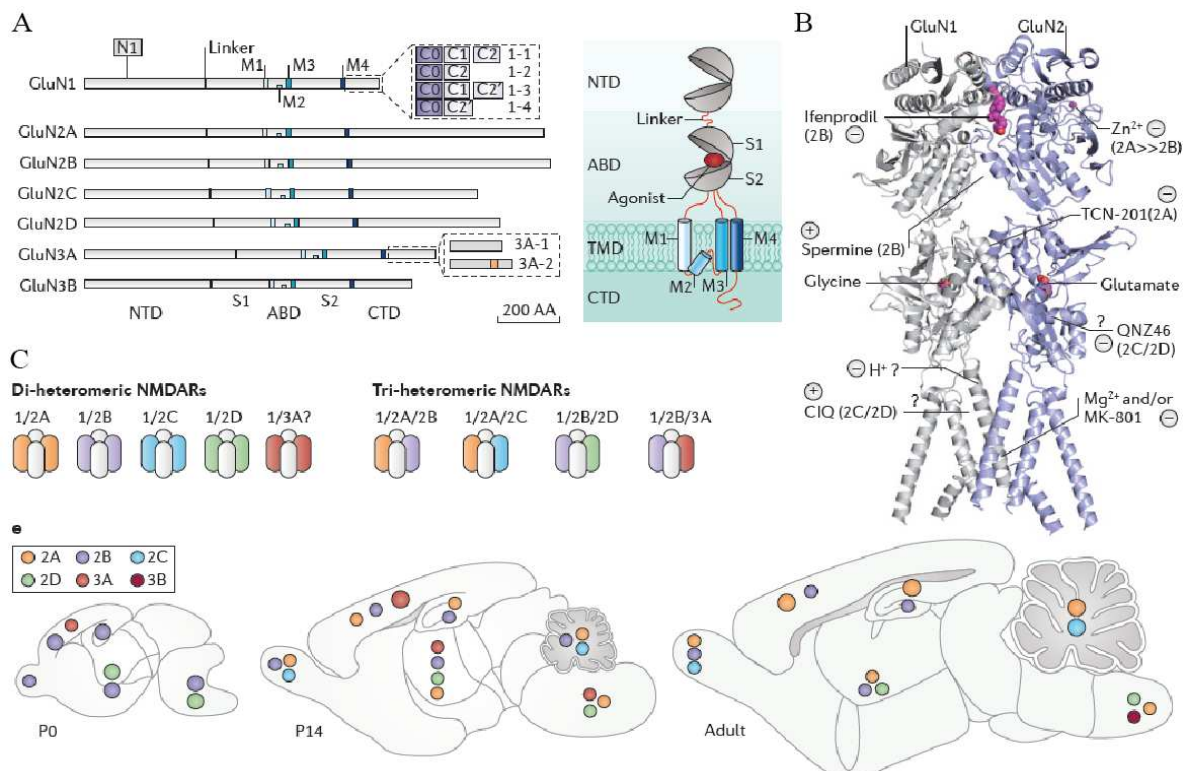


Figure 2.7. Diversité des sous-unités des récepteurs NMDA, structure et localisation. **A.** Sept gènes de rNMDA ont été clonés : GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B. Cette hétérogénéité est renforcée par l'épissage alternatif des sous-unités GluN1 et GluN3A. **B.** L'ensemble des sous-unités partage une topologie commune, avec quatre domaines : le NTD, l'ABD, le TMD et le CTD. Les rNMDAs disposent de nombreux sites de liaison pour de petits ligands extracellulaires qui agissent comme modulateurs allostériques (positifs, +, ou négatifs, -). Le modèle d'un rNMDA entier a été obtenu par analogie avec les structures des NTDs de GluN1/GluN2B (Karakas et al., 2011), des ABDs de GluN1/GluN2A (Furukawa et al., 2005), et la région transmembranaire du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009). **C.** Différentes populations de rNMDAs di-hétéromériques et tri-hétéromériques sont exprimés dans le SNC (haut). Le profil de développement des sous-unités GluN2 et GluN3 de rNMDA dans un cerveau de souris, depuis la naissance jusqu'à l'adulte. *D'après Paoletti et al., 2013*

La sous-unité GluN1, obligatoire pour obtenir des récepteurs fonctionnels, est exprimée de façon ubiquitaire dans le SNC, qu'il soit embryonnaire ou adulte (Akazawa et al., 1994). Cependant, on observe certaines variations selon le variant d'épissage, en fonction du stade de développement et de la localisation dans le SNC (Fig. **2.8, bas**). Dans la majeure partie des régions cérébrales, les isoformes "a" sont dominantes, même s'il existe quelques exceptions, notamment dans le cervelet. Le schéma d'expression des sous-unités GluN2 dépend à la fois du stade de développement et de la région du SNC concernée (Fig. **2.7.C. et 2.8, haut** ; Watanabe et al., 1993 ; Akazawa et al., 1994 ; Monyer et al., 1994). Dans le cerveau embryonnaire, seules les sous-unités GluN2D et GluN2B sont exprimées, principalement dans le mésencéphale pour GluN2D et abondamment dans le cortex, le thalamus et la moelle épinière pour GluN2B. Deux semaines après la naissance, le « pattern » d'expression des sous-unités GluN2 a évolué. Alors que l'expression de GluN2A augmente graduellement, celle de la sous-unité GluN2B, suite à un pic vers les 7-10 jours après la naissance, est progressivement restreinte à des zones du prosencéphale (cortex, hippocampe, striatum, bulbe olfactif), où elle est toujours fortement exprimée. La sous-unité GluN2C apparaît tardivement, seulement 7 jours environ après la naissance et reste confinée principalement dans les cellules granulaires du cervelet (Watanabe et al., 1993). Après la naissance, l'expression de GluN2D chute fortement et, chez l'adulte, la sous-unité n'est plus que faiblement présente dans le diencephale et le tronc cérébral. Dans l'hippocampe adulte, les sous-unités GluN2A et GluN2B sont majoritaires dans les cellules pyramidales, tandis que GluN2C et GluN2D apparaissent dans différents sous-types d'interneurones. Rappelons enfin que, dans de nombreuses régions cérébrales, on peut retrouver exprimées, dans un même récepteur, deux types de sous-unités GluN2. Des récepteurs trihétéromériques ont ainsi été décrits dans le prosencéphale (GluN1/GluN2B/GluN2D) ou dans le cervelet (GluN1/GluN2A/GluN2C) (Sheng et al., 1994 ; Didier et al., 1995 ; Chazot & Stephenson, 1997). Par ailleurs, les sous-unités GluN3A et GluN3B ont un profil ontogénétique unique (Henson et al., 2010 ; Low & Wee, 2010). L'expression de GluN3A suit une courbe en cloche avec un maximum huit jours après la naissance tandis que celle de GluN3B, faible à la naissance augmente progressivement jusqu'au stade adulte. La sous-unité GluN3B, dont la répartition dans le SNC est ubiquitaire, joue probablement un rôle important dans les fonctions des rNMDAs adultes. Le récepteur dihétéromérique GluN1/GluN3, activé uniquement par la glycine (Nilsson et al., 2007 ; Yao & Mayer, 2006), n'a été observé qu'en système recombinant (Chatterton et al., 2002) et non in vivo (ou exceptionnellement ; Pina-Crespo et al., 2010). En réalité, il est fort probable que la sous-unité GluN3 ne soit présente

qu'au sein de récepteurs trihétéromériques GluN1/GluN2/GluN3. Ces trihétéromères se caractérisent par des propriétés biophysiques uniques et des courants plus faibles que les récepteurs GluN1/GluN2.

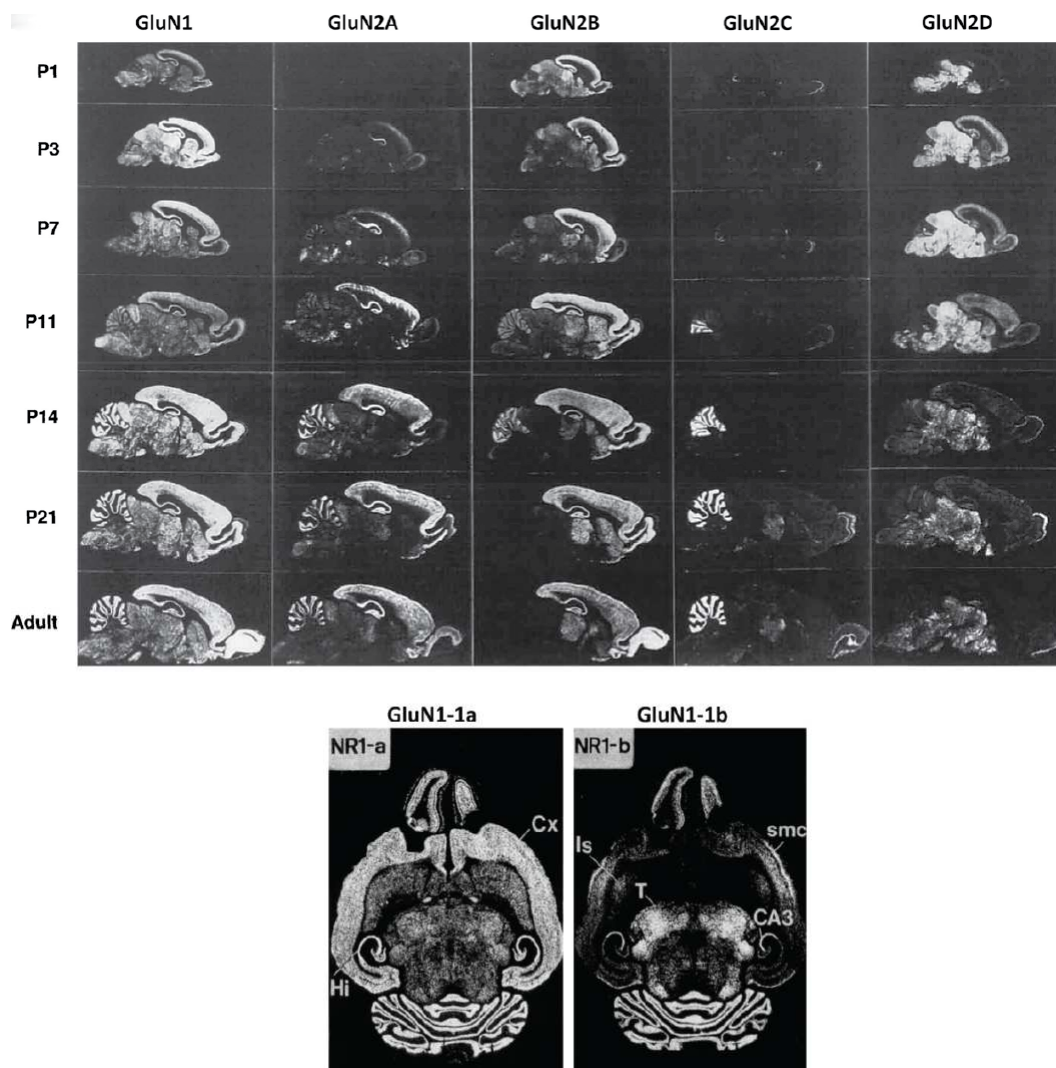


Figure 2.8. Distribution spatiale et temporelle des sous-unités des récepteurs NMDA dans le SNC. **A.** Evolution post-natale de la distribution des ARN codant pour les sous-unités GluN1 et GluN2A-D dans des cerveaux de rats âgés (coupe sagittale). **B.** Expression des ARNm des variants d'épissage 1a et 1b de la sous-unité GluN1 dans le SNC, à P12 (sections horizontales). *D'après Akazawa et al., 1994 (A) et Laurie & Seeburg, 1994 (B).*

Principalement post-synaptiques, les rNMDAs ont aussi été détectés sur des sites extra-synaptiques, d'où ils peuvent être recrutés pour remplacer les récepteurs synaptiques (Tovar & Westbrook, 2002). La diffusion latérale des rNMDAs dans la membrane est cependant plus lente que celle observée pour les rAMPA, et dépend à la fois de la nature de la sous-unité GluN2 présente et de l'état de phosphorylation du récepteur (Groc et al., 2004, 2006). On peut aussi trouver des rNMDAs sur la membrane pré-synaptique, où ils peuvent influencer la libération de neurotransmetteurs (Harris & Petit, 2007 ; Bidoret et al., 2009; Zhang & Diamond, 2009 ; Petralia et al., 2010). La composition en sous-unités varie d'un site à l'autre (la sous-unité GluN2B par exemple est particulièrement abondante aux sites extracellulaires), sans pour autant respecter une répartition simple des sous-unités en fonction de la région subcellulaire (Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004 ; Köhr, 2006). Enfin, les rNMDAs sont présents non seulement dans les neurones mais aussi dans les cellules gliales, notamment dans les oligodendrocytes, où leur composition est enrichie en GluN2C et GluN3A (Traynelis et al., 2010).

Les rNMDAs GluN1/GluN2 nécessitent la liaison de deux agonistes différents pour être activés : le glutamate qui se fixe sur la sous-unité GluN2, mais aussi un co-agoniste, qui peut être la glycine (Johnson & Ascher, 1987; Kleckner & Dingledine, 1988) ou la D-sérine (Matsui et al., 1995) et qui se fixe sur la sous-unité GluN1. La D-sérine, ligand fonctionnellement identique à la glycine (Mothet et al., 2000), est surtout détectée dans le cerveau antérieur où elle serait le co-agoniste endogène préférentiel des rNMDAs (Schell, 2004 ; Papouin et al., 2012). Une étude récente (Papouin et al., 2012) a confirmé le rôle important de la D-sérine. De façon intéressante, ils ont mis en évidence une utilisation différentielle de la glycine et de la D-sérine dans le CA1 de l'hippocampe : les récepteurs synaptiques sont sensibles à la D-sérine tandis que les récepteurs extrasynaptiques sont sensibles à la glycine. La présence du co-agoniste étant obligatoire pour l'activation des rNMDAs, des variations de la concentration locale de co-agoniste peuvent moduler les réponses NMDA. Par exemple, l'activité des rNMDAs peut être régulée par les astrocytes, cette classe de cellule gliale pouvant synthétiser et libérer de la D-sérine (Panatier et al., 2006).

2.2.5.2 Propriétés biophysiques

Les rNMDAs "classiques" (sans la sous-unité GluN3) ont des propriétés biophysiques spécifiques qui les distinguent des autres iGluRs, rAMPA et rKAs notamment (Fig. 2.9.B ; Dingledine et al., 1999). Tout d'abord, leur activation requiert la présence de **deux agonistes**, glutamate et glycine (ou D-sérine). Ensuite, les courants rNMDAs sont dépendants du potentiel : ils ne peuvent s'activer qu'après dépolarisation de la membrane, afin de relever le **blocage exercé par les ions Mg^{2+}** extracellulaires sur le canal. En effet, des concentrations physiologiques de Mg^{2+} dans le milieu extracellulaire (1-2 mM) inhibent fortement les réponses des rNMDAs au potentiel électrique (négatif) de repos des neurones. Ainsi, à -60 mV, l'inhibition est quasi-totale, alors qu'elle est inexistante aux potentiels dépolarisés. Cette sensibilité au blocage magnésium confère aux rNMDAs le rôle de **détecteurs de coïncidence** capables d'intégration synaptique, entre éléments pré- et post-synaptiques. De fait, pour qu'il y ait activation des rNMDAs post-synaptiques il faut que les éléments pré-synaptiques libèrent du glutamate, et donc qu'ils soient dépolarisés. Puis pour que les ions traversent leur canal, il faut que les éléments post-synaptiques aussi soient dépolarisés pour lever le blocage par les ions. Les rNMDAs sont également **perméables au Ca^{2+}** contrairement à la majorité des iGluRs. Ensuite, les rNMDAs se caractérisent par **des cinétiques d'activation et de désactivation lentes**, comparées à celles des rAMPAs et rKAs (Fig. 2.9.A). En effet, ils s'activent en quelques millisecondes et prennent plusieurs dizaines voire centaines de millisecondes pour se désactiver. Enfin, leur activité est sujette à de **multiples modulations** induites par des composés extracellulaires, habituellement des petites molécules ou des ions, dont certains, comme H^+ et Zn^{2+} sont présents de façon endogène dans le SNC, agissant sur le récepteur comme modulateurs allostériques. L'ensemble de ces propriétés confèrent aux rNMDAs un rôle essentiel dans l'initiation de diverses formes de **plasticité synaptique** comme la plasticité à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD), essentielles aux phénomènes d'apprentissage et de mémoire (Bliss & Collingridge, 1993). Ces propriétés, de même que leur sensibilité aux agonistes, leur conductance unitaire et leur probabilité d'ouverture maximale sont très variables selon les sous-unités composant le récepteur, le type de sous-unité GluN2 incorporée étant la principale source de cette diversité fonctionnelle (Fig. 2.9 ; Cull-Candy & Leszkiewicz, 2004 ; Paoletti & Neyton, 2007 ; Paoletti et al., 2013).

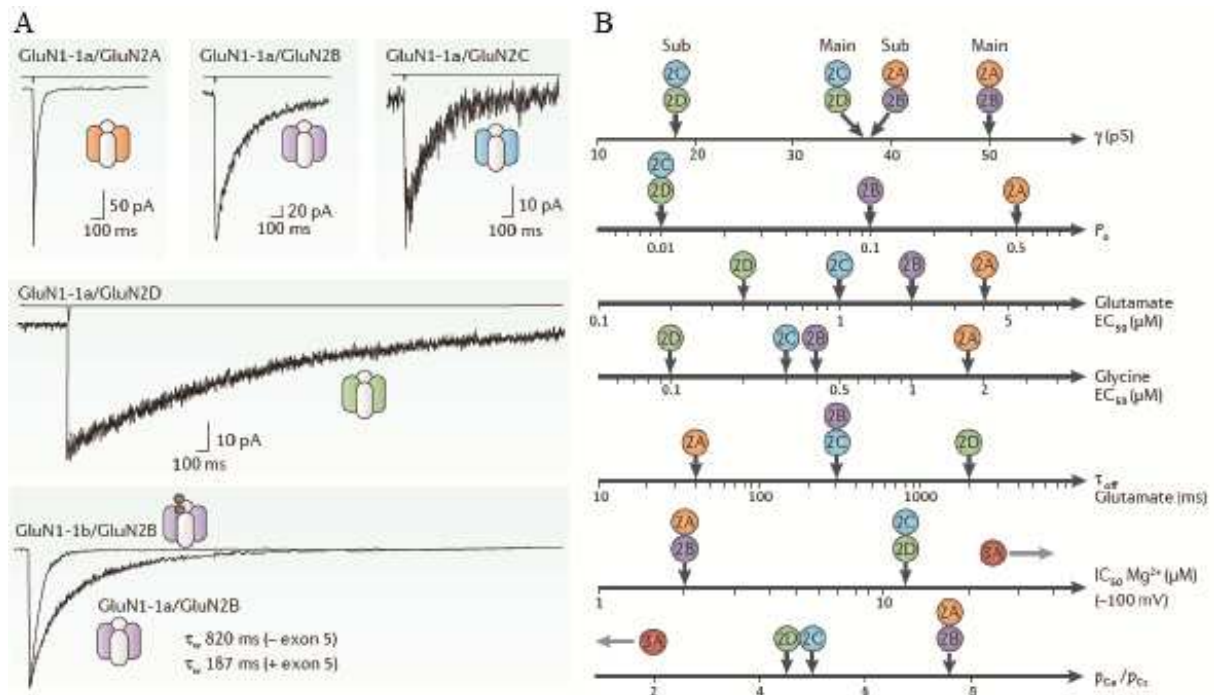


Figure 2.9. Propriétés biophysiques des différents sous-types de récepteurs NDMA, selon les sous-unités GluN1 et GluN2 incorporées. **A.** Cinétiques de désactivation de rNMDAs activés par des applications courtes (1 ms) de glutamate en conditions saturantes (1 mM). Les cinétiques sont beaucoup plus rapides dans le cas des rNMDAs contenant GluN2A. **B.** Les différents sous-types de rNMDAs se caractérisent par des propriétés biophysiques distinctes. La conductance unitaire (γ), la probabilité maximale d'ouverture (P_o), l'affinité pour les agonistes glycine et glutamate (EC_{50}), la constante de temps de désactivation (τ_{off}), la sensibilité au bloc Mg^{2+} (IC_{50} à -100 mV) et la perméabilité calcique (p_{Ca}/p_{Cs}) sont représentées. *D'après Paoletti et al., 2013.*

Affinité des rNMDAs pour leurs agonistes

L'affinité pour les agonistes est fortement dépendante de la sous-unité GluN2 incorporée au rNMDA (Fig.2.9.B ; Paoletti, 2011). Par exemple, si le site de liaison de la glycine est bien commun à tous les sous-types de rNMDAs, son affinité dépend de la sous-unité GluN2 présente (Monyer et al., 1992; Mori & Mishina, 1995). Par ailleurs, la liaison du glutamate sur GluN2 réduit l'affinité apparente du récepteur pour la glycine sur GluN1 et vice-versa. On parle de couplage négatif entre site glycine et site glutamate (Regalado et al., 2001). Les interactions moléculaires directes entre les ABDs des sous-unités GluN1 et ceux des sous-

unités GluN2 au sein d'un hétérodimère GluN1/GluN2 (unité fonctionnelle au niveau des ABDs ; voir **2.2.6.1**) participent probablement à ce phénomène (Regalado et al., 2001), mais pas seulement : il a été montré récemment que l'identité du NTD de GluN2 influençait également l'affinité du récepteur pour la glycine (Yuan et al., 2009).

L'affinité pour le glutamate diffère également d'un facteur dix entre les différents sous-types de rNMDA, les plus sensibles étant les récepteurs contenant GluN2D et les moins sensibles, les récepteurs contenant GluN2A, ceux contenant GluN2B ou GluN2C affichant une sensibilité intermédiaire. Les cinétiques de désactivation (temps caractéristique de diminution du courant après une brève application de glutamate) suivent le même ordre, avec les récepteurs GluN1/GluN2A se désactivant nettement plus rapidement (40 ms) que les récepteurs GluN1/GluN2D (2s) (Monyer et al., 1994 ; Vicini et al., 1998 ; Yuan et al., 2009). Ce paramètre est d'autant plus important qu'il gouverne la durée de la composante lente (due aux rNMDAs) des courants post-synaptiques excitateurs (Lester et al., 1990). Il est à noter que la nature de la sous-unité GluN1 influence également les cinétiques du récepteur puisque la présence de l'exon 5 (isoformes GluN1-b) accélère la désactivation (Rumbaugh et al., 2000 ; Vance et al., 2012). Les déterminants moléculaires à l'origine de ces différences sont eux aussi mal connus. De fait, d'après la structure cristallographique du dimère d'ABDs GluN1/GluN2A (pdb 2A5T), les résidus en contact direct avec le glutamate sont strictement conservés dans toutes les sous-unités GluN2. Les différences d'affinité pour le glutamate ne proviennent donc pas de la structure de la poche en tant que telle, mais plutôt de la stabilité relative du domaine bilobé dans l'état fermé pour chacun des ABDs liant l'agoniste. Les interactions interlobes jouent donc un rôle essentiel dans l'affinité des rNMDAs pour le glutamate. Il est à noter également que, comme pour la sensibilité à la glycine, les NTDs (des sous-unités GluN2 notamment) ont un rôle dans le contrôle de l'efficacité du glutamate (Yuan et al., 2009).

Perméabilité ionique, conductance et bloc magnésium

La conductance ionique unitaire, le blocage par le magnésium et la perméabilité calcique d'un rNMDA sont liés à sa composition en sous-unités (Fig. **2.9.B** et **2.10** ; Stern et al., 1992 ; Dingledine et al., 1999 ; Cull-Candy et al., 2001 ; Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013). Les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A ou GluN2B possèdent de larges conductances (avec des valeurs de conductances principale et secondaire d'environ 50 pS et 38 pS respectivement) et sont les plus sensibles à l'inhibition par les ions Mg^{2+} extracellulaires, tandis que les récepteurs contenant GluN2C ou GluN2D se caractérisent par des conductances plus faibles (avec des valeurs de conductances principale et secondaire d'environ 37 pS et 18 pS respectivement) et une sensibilité moins importante aux ions Mg^{2+} (Premkumar et al., 1997 ; Kuner & Schoepfer, 1996 ; Qian et al., 2005 ; Qian & Johnson, 2006 ; Cull-Candy & al., 2001 ; Dingledine et al., 1999 ; Paoletti et al., 2013). La perméabilité calcique est plus importante pour les récepteurs contenant GluN2A ou GluN2B que pour ceux contenant GluN2C ou GluN2D (Burnashev et al., 1995; Schneggenburger, 1996). Il est à noter que les valeurs de perméabilité calcique des rNMDAs sont les valeurs connues les plus élevées au sein des canaux activés par des ligands extracellulaires (Rogers & Dani, 1995). Cependant, le rôle spécifique de chaque sous-unité dans la perméabilité des rNMDAs est encore mal connu. La région M1-M3, qui forme le cœur du canal, est fortement conservée entre les différentes sous-unités GluN2, mais les quelques différences qui existent contribuent certainement aux différences de propriétés de perméation.

En effet, d'un point de vue moléculaire, la perméabilité ionique des rNMDAs est dictée principalement par des résidus de la "P-loop" (région M2) (Burnashev et al., 1992b ; Sakurada et al., 1993; Mori & Mishina, 1995). Contrairement aux rAMPA et aux rKAs, il n'y a pas d'édition des ARNs pré-messagers codants pour les sous-unités de rNMDAs, qui présentent une asparagine au niveau du site Q/R/N. L'absence de charge positive à ce niveau est compatible avec la forte perméabilité calcique des rNMDAs (Jahr and Stevens, 1987; Mayer et al., 1987; Ascher & Nowak, 1988 ; Burnashev et al., 1992bchad). Etant donné sa position critique, il n'est pas étonnant que le site Q/R/N influence, outre la perméabilité calcique, la conductance individuelle (Swanson et al., 1996 ; Traynelis & Wahl, 1997), le bloc magnésium (Burnashev et al., 1995 ; Kleckner & Dingledine, 1991 ; Mori et al., 1992), et le

blocage du pore par les polyamines (Bowie & Mayer, 1995 ; Kamboj et al., 1995). Par ailleurs, le motif DRPEER situé en sortie d'hélice M3 des sous-unités GluN1 contribue également à la forte perméabilité calcique des rNMDAs (Watanabe et al., 2002), probablement en créant un environnement électrostatique local favorable à l'accumulation des ions divalents Ca^{2+} (Dai & Zhou, 2013) . Enfin, plus récemment, un résidu unique (le site S/L) présent sur le segment M3 de GluN2 a été identifié comme un déterminant majeur des propriétés du canal, selon la sous-unité GluN2 incorporée (Clarke et al., 2013). Il intervient à la fois dans le contrôle "sous-unité dépendant" du blocage magnésium, la perméabilité relative au calcium et les conductances individuelles.

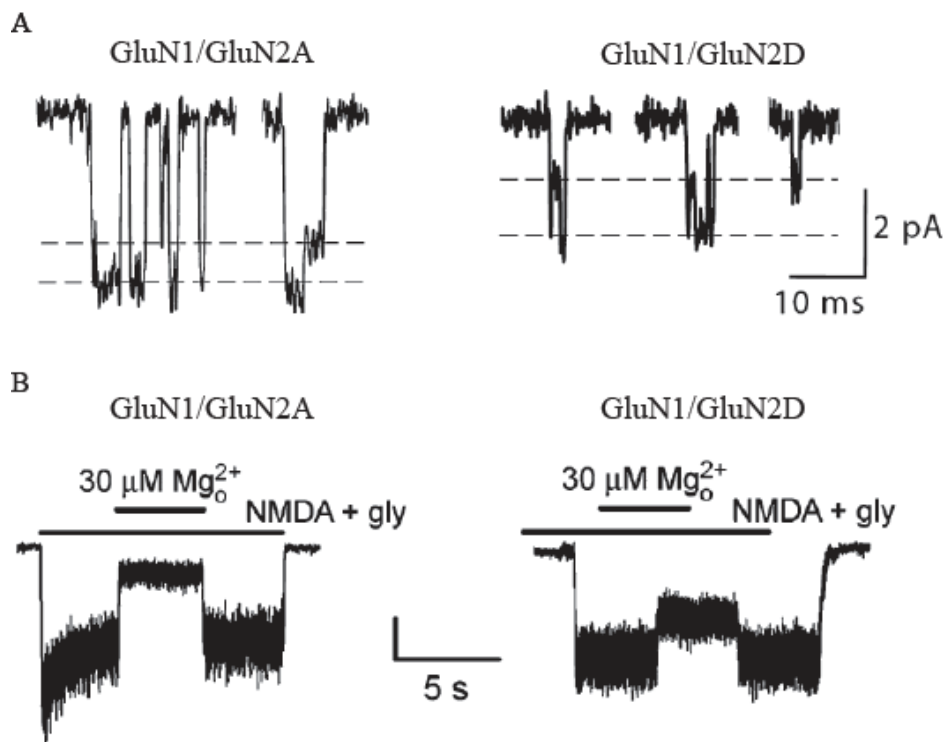


Figure 2.10. Les différents sous-types de récepteur NMDA GluN1/GluN2 diffèrent dans leurs propriétés de perméation. A- Conductances unitaires enregistrées pour des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2D dans des cellules HEK (1 mM Ca^{2+} externe, $V_h = -85$ mV). Les lignes pointillées représentent les conductances principales et secondaires (traces de B.S. Retchless et J.W. Johnson). B- Blocage par le magnésium extracellulaire (30 μM) pour les récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2D (d'après Qian et al., 2005). D'après Paoletti, 2011.

Probabilités d'ouverture et cinétiques d'activation

La probabilité maximale d'ouverture (P_o), c'est à dire la probabilité pour que le canal soit dans l'état ouvert alors que tous les sites de liaison des agonistes sont occupés, varie considérablement selon le sous-type de rNMDAs (Fig. 2.9.B ; 2.11). Relativement élevée pour un récepteur GluN1/GluN2A (~0.5), elle est très faible pour les récepteurs GluN1/GluN2C et GluN1/GluN2D (~ 0.01), et intermédiaire pour les récepteurs GluN1/GluN2B (~ 0.1) (Wyllie et al., 1998 ; Chen et al., 1999 ; Erreger et al., 2005; Dravid et al., 2008). En outre, la stabilité des états ouverts des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2C ou GluN2D est significativement plus faible que celle des récepteurs contenant GluN2A ou GluN2B. La présence des sous-unités GluN2C et GluN2D dans un rNDMA induit donc une activité faible mais prolongée, tandis que la sous-unité GluN2A, et, dans une moindre mesure GluN2B, confèrent au récepteur une activité relativement importante mais transitoire.

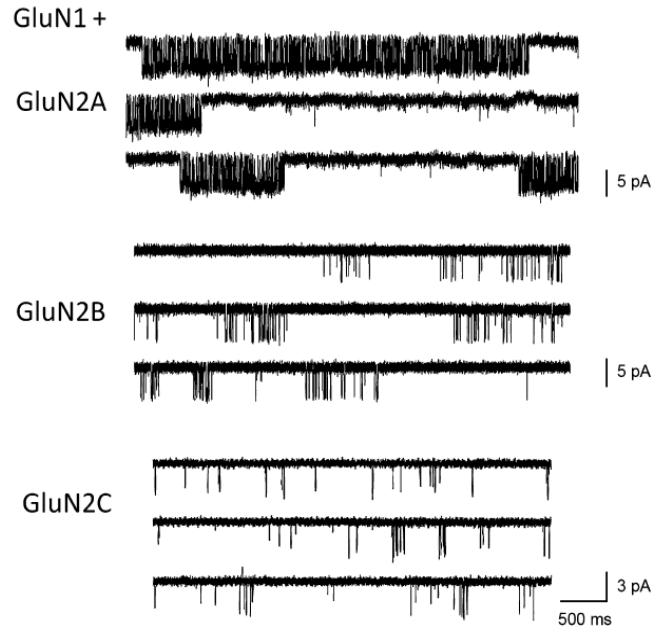


Figure 2.11. La nature de la sous-unité GluN2 influe sur la probabilité d'ouverture maximale du canal ionique. Enregistrements électrophysiologiques d'un canal unique "one-channel patch" de récepteur GluN1/GluN2A, GluN1/GluN2B ou GluN1/GluN2C, en configuration « outside-out », donnant un accès direct à la probabilité d'ouverture P_o individuelle. Les rNMDAs sont activés par une application de 1 mM glutamate et 50 μ M glycine (concentrations saturantes). D'après Paoletti, 2011, données issues de Erreger et al., 2005 et Dravid et al., 2008.

2.2.5.3. Modulations allostériques

L'activité des rNMDAs peut être modulée, soit positivement, soit négativement, par des petites molécules et ions dont le site de liaison est différent des ABDs et du canal ionique (Fig. 2.7.B et 2.12 ; Mony et al., 2009 ; Traynelis et al., 2010). Ces modulateurs, dits allostériques, peuvent être endogènes, c'est-à-dire présents naturellement dans le SNC : c'est le cas des protons (H^+) et du zinc (Zn^{2+}). Ils peuvent également être exogènes, comme c'est le cas pour l'ifenprodil, molécule organique de synthèse. D'une façon générale, les modulateurs allostériques présentent trois avantages par rapport aux ligands (agonistes, antagonistes compétitifs) se fixant sur les sites de liaison des agonistes, encore appelés sites orthostériques : ils n'interfèrent pas directement avec le processus d'activation, etc, du récepteur ; ils ne sont généralement pas en compétition avec des ligands endogènes ; et, en visant des régions moins conservées que le pore ou les ABDs, les modulateurs allostériques peuvent cibler sélectivement certains sous-types de récepteurs, ce qui est rare avec les ligands de sites orthostériques (Mony et al., 2011). Ces sites allostériques représentent donc des cibles intéressantes d'un point de vue thérapeutique, avec l'espoir d'effets secondaires plus restreints que dans le cas d'un ciblage des sites orthostériques (Bertrand & Gopalakrishan, 2007).

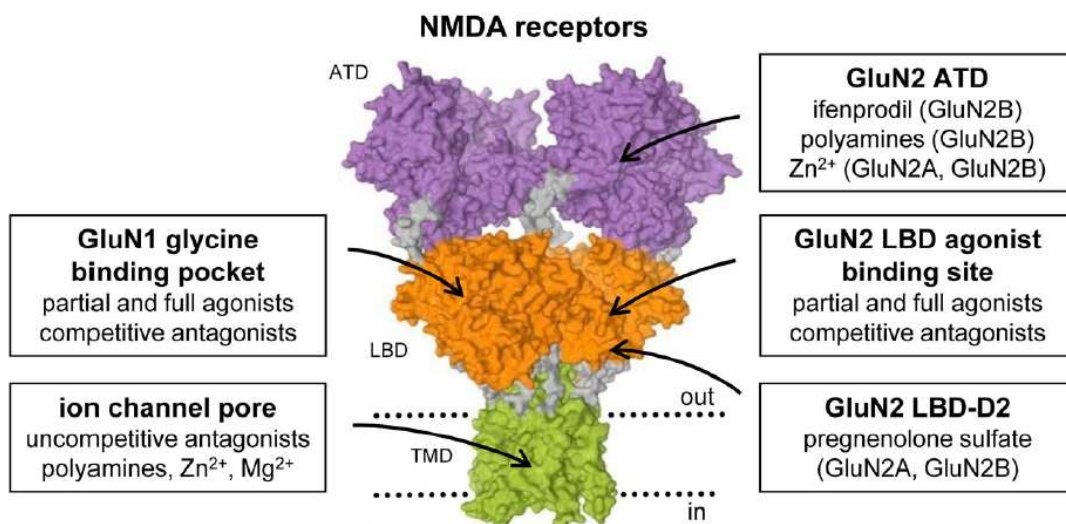


Figure 2.12. Le récepteur NMDA possède de nombreux sites de liaison pour des ligands extracellulaires, notamment des sites dits allostériques qui lient des petites molécules ou ions capables de réguler l'activité du récepteur. Ces sites allostériques peuvent se situer au niveau des domaines NTDs, dans la poche interlobes de GluN2 pour la liaison du zinc ou à l'interface entre les NTDs de GluN1 et GluN2B pour celle de l'ifenprodil et de la spermine. *De Traynelis et al., 2010*

Modulation par les protons

Les rNMDAs sont sujets à une inhibition tonique par les protons extracellulaires (Tang et al., 1993 ; Traynelis & Cull-Candy, 1990 ; Vyklicky, 1990), qui induisent une inhibition totale des courants portés par les rNMDAs, en piégeant leur canal dans un état fermé. Lors des ischémies cérébrales, l'acidose, en inhibant les rNMDAs, pourrait avoir un rôle protecteur, car elle limiterait l'excitotoxicité induite par l'excès de glutamate dans le milieu extracellulaire (Giffard et al., 1990). Les protons agissent indépendamment du potentiel de membrane et sans changer la sensibilité du récepteur aux agonistes. Au niveau du canal unique, ils réduisent la probabilité d'ouverture du canal sans en changer la conductance unitaire (Banke et al., 2005; Erreger & Traynelis, 2008). La sensibilité aux protons varie en fonction de l'épissage de la sous-unité GluN1 (la cassette N1 diminue la sensibilité au proton ; Traynelis et al., 1995, 1998) et selon la sous-unité GluN2 présente. Ainsi, elle est la plus élevée pour les récepteurs GluN1/GluN2B et GluN1/GluN2D ($\text{pH}(\text{IC}_{50}) \sim 7.5$) et la plus basse pour GluN1/GluN2C ($\text{pH}(\text{IC}_{50}) \sim 6.6$), les récepteurs GluN1/GluN2A ayant une sensibilité intermédiaire ($\text{pH}(\text{IC}_{50}) \sim 6.9$) (Traynelis et al., 1995; Low et al., 2003; Gielen et al., 2009). Les valeurs de l' IC_{50} , proches du pH physiologique (~ 7.3), pour les récepteurs contenant GluN2B ou GluN2D sont critiques car la moindre variation de pH, comme cela arrive lors d'événements excitotoxiques (Traynelis et al., 1995) aura des répercussions importantes sur l'amplitude des courants. En outre, l'inhibition par les protons est intimement liée à la modulation des récepteurs par l'ifenprodil, les polyamines et le zinc, car tous altèrent la fonction du rNMDA en déplaçant le pK_a de senseur proton. Le site de liaison du proton sur le rNMDA, si tant est qu'il soit unique et localisé, n'a pas encore été déterminé. Des mutations au niveau des NTDs, des ABDs ou encore des TMDs peuvent affecter la sensibilité du récepteur au proton (Low et al., 2003; Gielen et al., 2008, Mony et al., 2009). Cependant, les diverses études convergent plus vers une localisation du site de liaison des protons, en périphérie du pore, au niveau des « linkers » le reliant aux ABDs (Traynelis et al., 2010). Des expériences de mutagenèse ont en effet identifié des résidus de M3 et du « linker » M3-S1, près de la porte du canal, qui pourraient former le site de liaison du proton. Des séquences divergentes entre GluN2C d'une part et GluN2A-B d'autre part, sur le linker « S2-M4 » pourraient quant à elle expliquer la plus faible sensibilité des récepteurs GluN1/GluN2C aux protons (Low et al., 2003).

Modulation par le zinc endogène

L'ion divalent Zn^{2+} est essentiel au développement neuronal, à la maturation et aux fonctions neuronales (Fig. 2.13 ; Sandstead, 2013). Les ions Zn^{2+} qui sont stockés dans des vésicules présynaptiques au niveau de certaines synapses glutamatergiques (Paoletti et al., 2009), sont également de puissants inhibiteurs allostériques des rNMDAs.

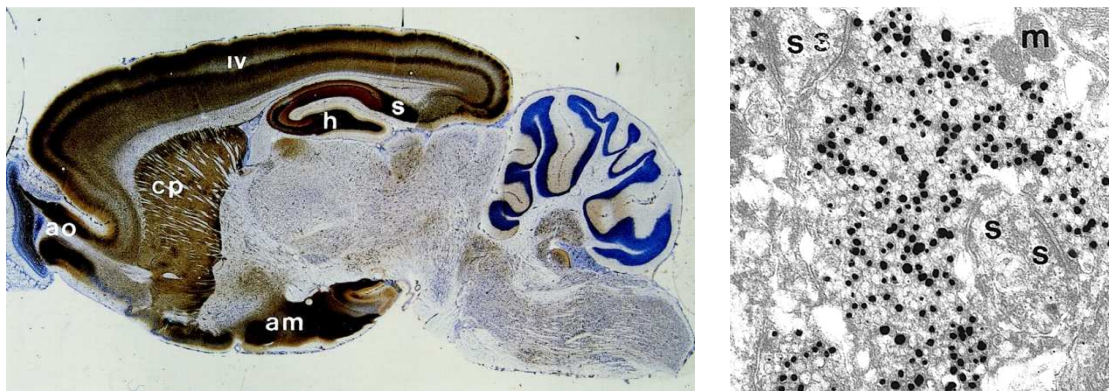


Figure 2.13. Distribution du zinc "libre" dans le cerveau. Les ions Zn^{2+} histochimiquement réactifs (dits 'zinc libre') sont révélés par le marquage de Timm. A gauche, coupe sagittale de cerveau de rat. Les régions riches en zinc sont, notamment, l'amygdale (am), le striatum (s), le cortex et l'hippocampe (h). Au niveau subcellulaire, les ions Zn^{2+} "libres" se situent dans les vésicules synaptiques de certaines terminaisons glutamatergiques. D'après *Frederickson et al., 2000*.

Découverte pour la première fois sur des rNMDAs natifs (Westbrook & Mayer, 1987), cette inhibition met en jeu deux types de mécanismes : un blocage du canal dépendant du potentiel, qui ressemble à celui exercé par les ions Mg^{2+} extracellulaires, et une inhibition indépendante du potentiel qui résulte d'une diminution de la P_o du canal (Christine & Choi, 1990 ; Legendre & Westbrook, 1990). La modulation de la P_o du canal par le zinc dépend fortement des sous-unités composant le récepteur (Fig. 2.14). Les récepteurs GluN1/GluN2A sont les rNMDAs les plus sensibles au zinc extracellulaire (IC_{50} de l'ordre du nanomolaire) et les récepteurs contenant GluN2C et GluN2D, les moins sensibles (IC_{50} de l'ordre de la dizaine

de micro-molaire), le récepteur GluN1/GluN2B, ayant une sensibilité intermédiaire (de l'ordre du micro-molaire) (Williams, 1996 ; Chen et al., 1997 ; Paoletti et al., 1997 ; Traynelis et al., 1998). En réalité, la sensibilité au zinc des récepteurs GluN1/GluN2A est telle que même le zinc ambiant présent dans les solutions salines est suffisant pour inhiber de façon constitutive ces récepteurs (Paoletti et al., 1997). Paradoxalement, le zinc augmente l'affinité apparente des récepteurs GluN1/GluN2A pour l'agoniste glutamate (Paoletti et al., 1997 ; Erreger et al., 2005). Le zinc fait donc entrer ces récepteurs dans un état inactif présentant une affinité augmentée pour l'agoniste caractéristique des états désensibilisés.

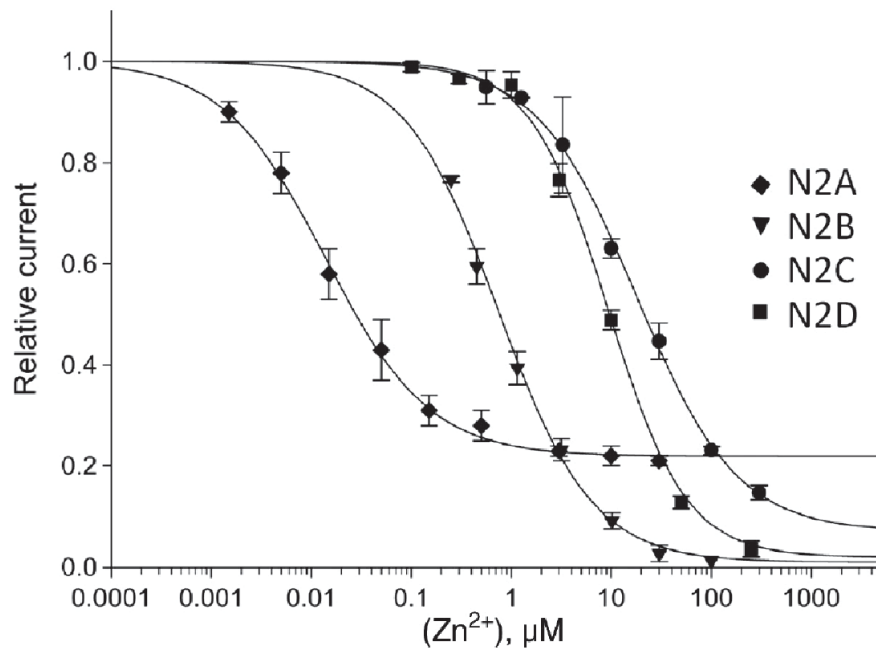


Figure 2.14. La sensibilité au zinc des récepteurs NMDA dépend de la sous-unité incorporée. Inhibition par le zinc Zn^{2+} des rNDMA contenant la sous-unité GluN1 associée à la sous-unité GluN2A, GluN2B, GluN2C ou GluN2D, exprimés en ovocytes de Xénope, à +50 mV (pour s'affranchir d'un blocage du pore aux fortes concentrations de zinc). *D'après Rachline et al., 2005*

L'inhibition par le zinc des récepteurs GluN1/GluN2A n'est pas totale mais sature à 80% du courant maximal (Paoletti et al., 1997). Ce courant résiduel s'explique par le fait que l'inhibition de haute affinité par le zinc agit via un renforcement de l'inhibition tonique par les

protons (Low et al., 2000 ; Erreger & Traynelis, 2008 ; Gielen et al., 2008). Ainsi, à pH physiologique, la concentration en protons n'est pas suffisante pour saturer les sites de liaison et par conséquent, l'inhibition par le zinc ne peut donc pas être totale (Fig. 2.15). En revanche, à très forte concentration de zinc ($> 10 \mu\text{M}$), les ions peuvent inhiber totalement les récepteurs GluN1/GluN2A et ce même à pH physiologique, en raison de la composante dépendante du potentiel (blocage du pore) qui intervient.

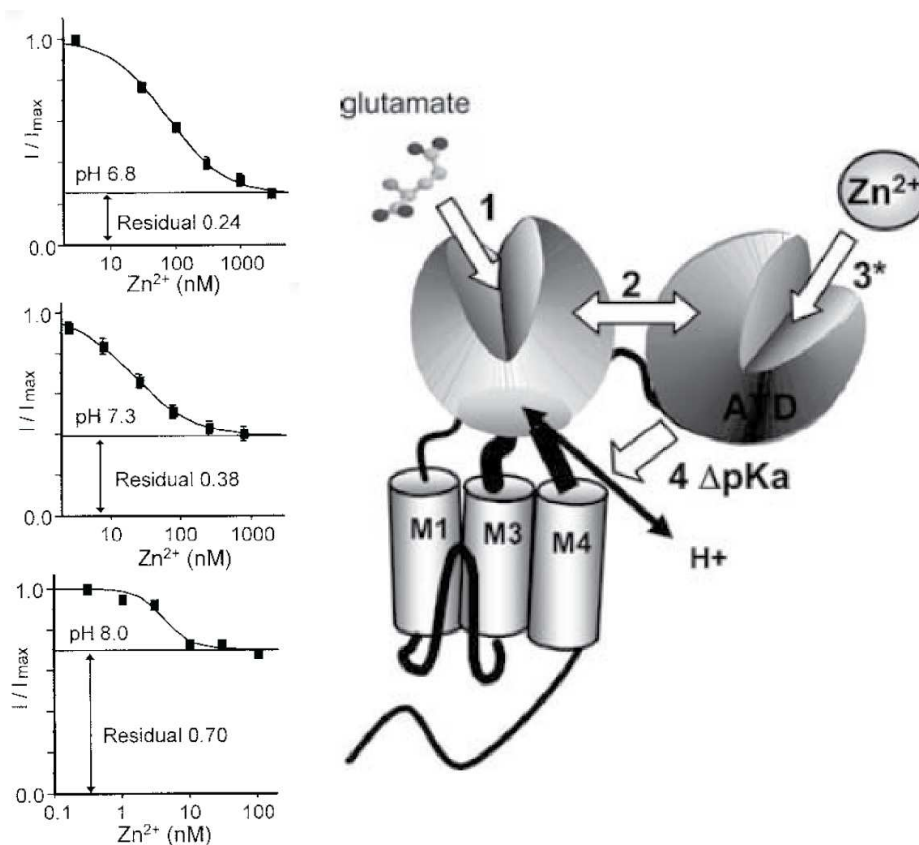


Figure 2.15. La modulation des récepteurs GluN1/GluN2A par le zinc implique un renforcement de l'inhibition par les protons. Gauche- Les courbes dose-réponse du zinc sont représentées à différents pH (6.8, 7.3 et 8.0). Les réponses sont dépendantes du pH, avec des IC_{50} respectifs de 74,3 nM, 24 nM et 4,46 nM. A pH acide, l'inhibition maximale par le zinc est plus importante qu'à pH alcalin. (D'après Low et al., 2000). Droite- Modèle représentant les événements moléculaires contribuant à la "désensibilisation" rapide des rNDMAs GluN1/GluN2A. Le modèle est basé sur un mécanisme en quatre étapes : (1) le glutamate se fixe dans la crevasse interlobes du NTD de GluN2A ; (2) la liaison du glutamate entraîne des changements conformationnels du NTD de GluN2A qui modifie la sensibilité au zinc ; (3) le système se relaxe vers un nouvel équilibre, tandis que l'occupation du site de liaison du zinc augmente (étape limitante) ; (4) des changements conformationnels affectent alors l'ensemble du récepteur et augmentent son affinité pour les protons, ce qui réduit *in fine* la probabilité d'ouverture du récepteur. D'après Erreger & Traynelis, 2005.

La modulation par le zinc des rNMDAs revêt probablement une importance physiologique. En effet, à certaines synapses glutamatergiques, la libération de glutamate, qui active les rNMDAs, pourrait être accompagnée, paradoxalement, d'une libération de zinc qui inhiberait ces mêmes récepteurs (Vogt et al., 2000 ; Paoletti et al., 2009). Le rôle physiologique et physiopathologique de l'interaction entre la modulation par le zinc et l'activité des récepteurs GluN1/GluN2A fait l'objet, au laboratoire, d'études sur une lignée de souris « knock-in » (KI) qui portent une mutation ponctuelle sur la sous-unité GluN2A (H128S) rendant les rNMDAs insensibles au zinc dans la gamme submicromolaire. Si les animaux KI se développent et se reproduisent normalement, ils montrent un phénotype douleur remarquable avec, une hyperalgie et allodynie prononcées dans des modèles de douleurs chroniques (inflammatoire et neuropathique) et une disparition complète des effets analgésiques d'applications de zinc exogène (Nozaki et al., 2011). Ce travail montre que le zinc agit bien comme modulateur endogène de la neurotransmission excitatrice *in vivo* et que l'interaction GluN2A-zinc est un événement moléculaire important dans le traitement de l'information douloureuse

Modulation par les polyamines

Les polyamines sont des polybases aliphatiques chargées positivement au pH physiologique. Certaines sont présentes de façon endogène, comme la spermine, la putrescine et la spermidine, dont les concentrations cytoplasmiques (dans des cellules HEK) sont comprises entre 50 et 150 μM , respectivement (Bowie & Mayer, 1995). La libération de ces polyamines endogènes par les cellules neuronales dépend de l'activité des rNMDAs (Rock & MacDonald, 1995) et peut être envisagée dans des conditions pathologiques, notamment lors d'ischémies cérébrales (Paschen et al., 1992). La spermine extracellulaire agit comme modulateur allostérique des rNMDAs, en engendrant des effets multiples (Benveniste et Mayer, 1993 ; Mony et al., 2009) : **(1)** une inhibition dépendante du potentiel, due au blocage du pore ($\text{IC}_{50} \sim 350 \mu\text{M}$ à -60 mV et 27 mM à 0 mV) ; **(2)** une potentialisation dépendante de la glycine, qui agit en augmentant l'affinité pour la glycine des récepteurs ayant incorporé GluN2A ($\text{EC}_{50}(\text{Gly}) \sim 1.1 \mu\text{M}$ et $1.7 \mu\text{M}$, en présence et en absence de spermine, respectivement) ou

GluN2B ($EC_{50}(\text{Gly}) \sim 0.2 \mu\text{M}$ et $0.4 \mu\text{M}$, en présence et en absence de spermine, respectivement) (Zhang et al., 1994) ; **(3)** une potentialisation indépendante du potentiel et de la glycine, qui peut être détectée à un potentiel dépolarisant et à des concentrations saturantes en glycine. Ce dernier effet est lié à une levée de l'inhibition tonique du récepteur par les protons. Le degré de potentialisation par les polyamines augmente donc avec la concentration en H^+ (Traynelis et al., 1995, 1998). Il est très sélectif puisqu'il ne concerne que les récepteurs ayant incorporé les sous-unités GluN2B et GluN1-1a (Fig. 2.16.A ; Williams et al., 1994 ; Zhang et al., 1994 ; Traynelis et al., 1995). L'affinité pour la spermine des récepteurs GluN1-1a/GluN2B se traduit par un EC_{50} de $150 \mu\text{M}$ et une potentialisation maximale des courants d'environ 300% à pH 7.3. Un ensemble de résidus acides présents sur le lobes inférieur des NTDs de GluN1 et de GluN2B uniquement (Mony et al., 2011) sont des candidats potentiels pour la liaison de ces polyamines chargées positivement (Fig. 2.16.B).

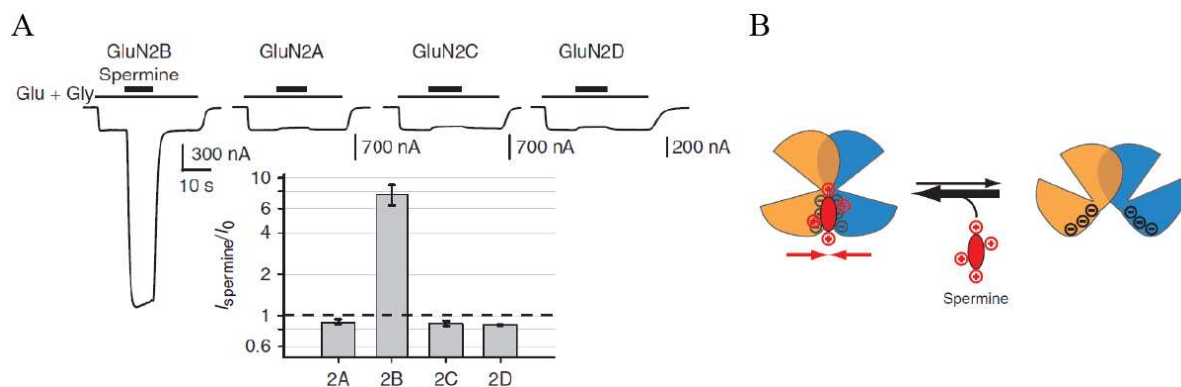


Figure 2.16. La spermine potentialise spécifiquement les courants portés par les récepteurs GluN1/GluN2B. A- Traces représentant le courant mesuré à pH 6.5 en présence de spermine ($200 \mu\text{M}$) appliqué sur des ovocytes de *Xénope* exprimant les récepteurs GluN1/GluN2. B- Schéma illustrant le mécanisme probable par lequel la spermine potentialise les récepteurs GluN1/GluN2B : elle neutraliserait les charges négatives présentes sur les lobes inférieurs de GluN1 et GluN2B et stabiliserait ainsi la conformation « NTDs fermés ». D'après Mony et al., 2011

Modulation oxydo-réductrice

Les rNMDAs sont très sensibles au potentiel oxydo-réducteur de l'environnement extracellulaire : en présence d'un oxydant comme le réactif d'Ellman (5,5'-Dithiobis-(2-Nitrobenzoic Acid ou DTNB), la réponse des rNMDAs est diminuée, alors qu'elle est potentialisée par l'agent réducteur dithiothréitol (DTT ; Aizenman et al., 1989 ; Sullivan et al., 1994). Des composés endogènes tels que les acides lipoïque et dihydrolipoïque (Tang & Aizenman, 1993), la pyrroloquinoline quinone, la forme oxydée du glutathion (Sucher & Lipton, 1991) et des radicaux libres oxygénés produits par la xanthine oxydase (Aizenman et al., 1990) semblent également moduler l'activité des rNMDAs. Par ailleurs, l'acide nitrique endogène (NO), un neurotransmetteur gazeux qui est impliqué dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Choi et al., 2000 , Culotta & Koshland, 1992 ; Hou et al., 1999), inhibe les rNMDAs *via* la S-nitrosylation (transfert de NO²⁺) de ses cystéines libres, notamment la C399 sur GluN2A (Choi et al., 2000). La sensibilité rédox des rNMDAs est contrôlée par deux cystéines présentes sur GluN1, C744 et C798 (Sullivan et al., 1994), qui sont engagées dans un pont disulfure, localisé sur le lobe inférieur de l'ABD à proximité du TMD (voir Résultats **1.3**). L'effet potentialisateur irréversible du DTT est renforcé dans les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2A. En effet, une deuxième composante, rapidement réversible, est présente chez ces récepteurs (Kohr et al., 1994). Cet effet n'est toutefois pas un effet rédox mais est dû à la chélation, par le DTE, du zinc contaminant (~ 100 nM), qui est capable d'inhiber toniquement les récepteurs GluN1/GluN2A (Paoletti et al., 1997 ; Choi et al., 2001).

Modulation par l'ifenprodil et ses dérivés

Les rNMDAs sont aussi modulés par des composés non-naturels (synthétiques), notamment l'ifenprodil, une phényléthanolamine qui agit comme un antagoniste non-compétitif des rNMDAs (Williams, 1993 ; Carter et al., 1988 ; Reynolds & Miller, 1989). L'ifenprodil, dont on dénombre maintenant des centaines d'analogues (Chenard & Menniti, 1999 ; Nikam &

Meltzer, 2002 ; Mony et al., 2009) inhibe spécifiquement les récepteurs GluN1/GluN2B pour lesquels il est cent fois plus sélectif que pour les autres sous-types de récepteurs (Fig. 2.17). L'origine structurale de la spécificité de l'inhibition par l'ifenprodil pour les récepteurs contenant GluN2B n'est toujours pas établie (Karakas et al., 2011). L'ifenprodil agit par deux voies distinctes, un blocage du pore dépendant du potentiel et une inhibition indépendante du potentiel, cette dernière étant à l'origine de la sensibilité submicromolaire des rNMDAs pour l'ifenprodil (Legendre & Westbrook, 1990 ; Perin-Dureau et al., 2002). D'un point de vue mécanistique, l'ifenprodil agit en faisant entrer le récepteur dans un état inactivé durable semblable à un état "désensibilisé", caractérisé par une plus grande affinité pour le glutamate. En effet, il a été montré qu'il existait une interaction allostérique positive entre la liaison de l'ifenprodil à l'interface des NTDs et la liaison du glutamate sur l'ABD de GluN2, dans les récepteurs GluN1/GluN2B (Kew & Kemp, 1998 ; Zheng et al., 2001) : la fermeture d'un des domaines « clam-shell » favorise celle de l'autre et vice-versa (Gielen et al., 2009 ; Zheng et al., 2001). De même que pour l'inhibition par le zinc des récepteurs GluN1/GluN2A, on suppose que l'inhibition par l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B reflète le renforcement de l'inhibition par les protons ambiants (Mott et al., 1998). Par ailleurs, malgré les différences de sites de liaison, zinc et ifenprodil favorisent la fermeture du NTD de GluN2 et le contraignent dans une conformation fermée similaire (Mony et al., 2009 ; Perin-Dureau et al., 2002).

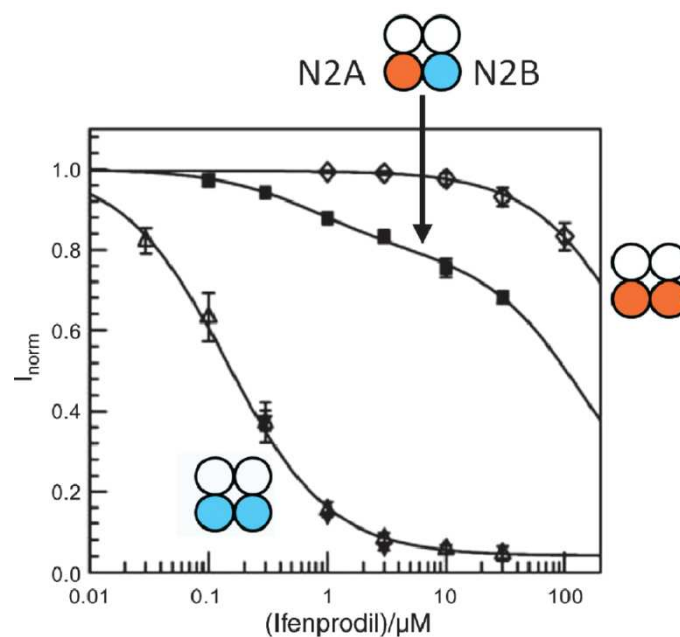


Figure 2.17. Les récepteurs NMDA sont inhibés par le composé synthétique ifenprodil de manière "sous-unité-spécifique". L'ifenprodil inhibe spécifiquement les récepteurs di-hétéromériques GluN1/GluN2B (données de Hatton & Paoletti, 2005). D'après Paoletti., 2011

Autres modulateurs allostériques

Des travaux récents ont permis d'identifier de nouvelles classes de ligands allostériques qui agissent de façon spécifique selon le type de sous-unités spécifiques, et qui potentialisent ou inhibent l'activité des rNMDAs. Ainsi, les neurostéroïdes (Kussius et al., 2009) ont été identifiés comme modulateurs allostériques positifs des rNMDAs contenant GluN2A ou GluN2B. Le TCN-201, quant à lui, inhibe spécifiquement les récepteurs contenant GluN2A par l'intermédiaire d'une réduction de l'affinité pour la glycine (Hansen & Traynelis, 2011). Les sites de liaison de ces modulateurs restent en revanche mal connus. Récemment, le QNZ46, un analogue de la quinazoline-4-one, et le DQP-1105, un dérivé de la digydroquinolone-pyrazoline, ont été identifiés comme représentants de deux classes d'inhibiteurs non-compétitifs, sélectifs des rNMDAs contenant GluN2C ou GluN2D (Mosley et al., 2010 ; Acker et al., 2011). De même, le CIQ est un modulateur allostérique positif des récepteurs contenant GluN2C ou GluN2D (Mullasseril et al., 2010)..

2.2.5.4. Rôle des NTDs dans la régulation de l'activité des récepteurs NMDA

Le domaine NTD est le domaine extracellulaire du rNMDA le plus éloigné de la membrane et donc du coeur de la machinerie de "gating" c'est-à-dire des régions qui sont directement responsables de l'activation, le pore et les ABDs. Il était donc tout à fait inattendu qu'un domaine aussi distal joue un rôle régulateur si essentiel. Et pourtant, il a été montré que les NTDs influencent les propriétés d'activation des rNMDAs (Gielen et al., 2009; Yuan et al., 2009), notamment leur sensibilité au glutamate, leurs cinétiques de désensibilisation et leur probabilité maximale d'ouverture. Le NTD de la sous-unité GluN2, ainsi que le "linker" le reliant à l'ABD, déterminent en grande partie la valeur de la probabilité maximale d'ouverture du récepteur. Des analyses de rNMDAs chimériques, pour lesquels les NTDs des sous-unités GluN2 ont été échangées, ont montré des changements de probabilité d'ouverture, du temps de réponse et de l'affinité pour les agonistes vers des valeurs en accord avec la nature du NTD

de ces chimères, ce qui suggère de nouveau le rôle prépondérant du NTD dans la régulation des fonctions du récepteur (Yuan et al., 2009 ; Gielen et al., 2009).

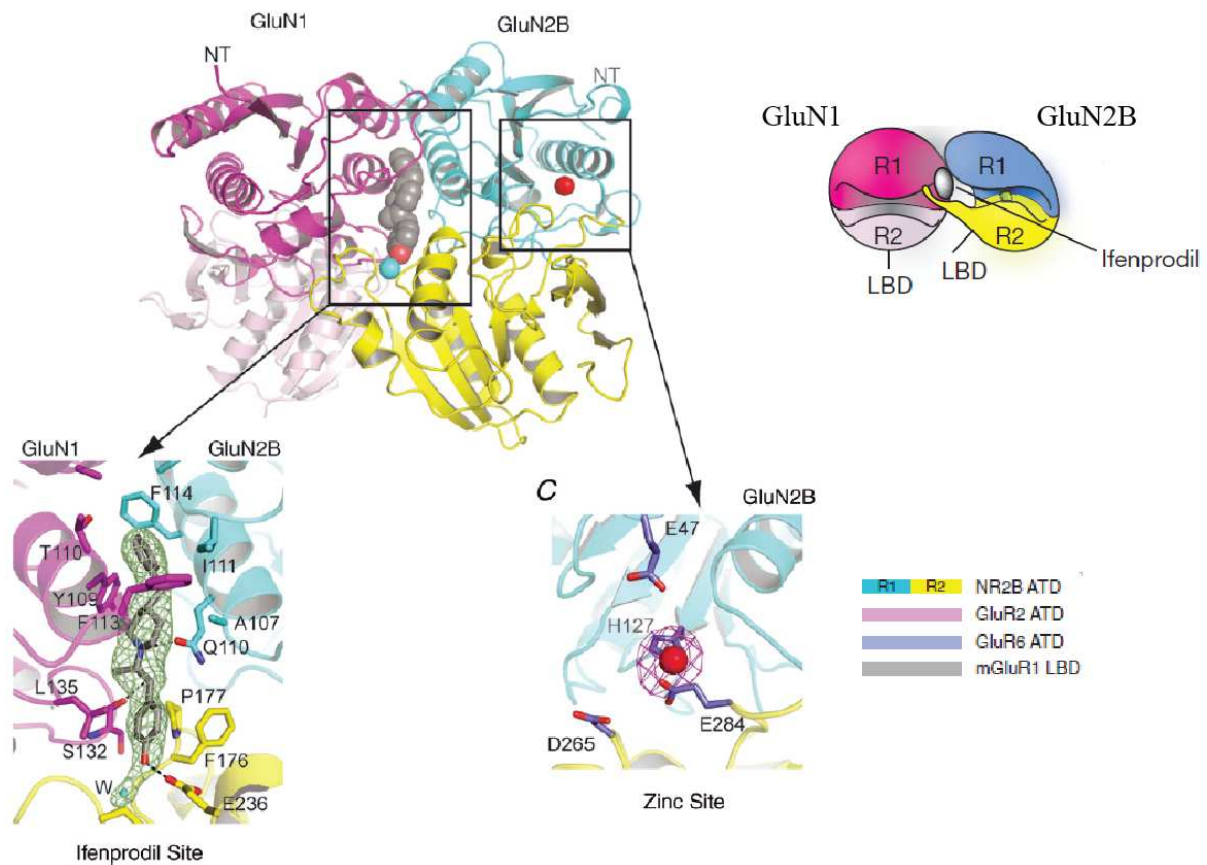


Figure 2.18. Sites de liaison du zinc et l'ifenprodil, deux modulateurs allostériques interagissant avec les domaines N-terminaux des récepteurs GluN1/GluN2B Les sites de liaison de l'ifenprodil (en bas à gauche), à l'interface entre les NTDs de GluN1 (lobe supérieur) et GluN2B (lobes supérieur et inférieur), et du zinc (en bas à droite), directement chélaté par l'His127 et le Glu284, sont représentés à partir des structures cristallographiques du dimère NTDs GluN1/GluN2B, en complexe respectivement avec l'ifenprodil (pdb 3QEL, Karakas et al., 2011) et du monomère NTD GluN2B avec le zinc (pdb 3JPJ, Karakas et al., 2009). Un dimère GluN1/GluN2B issu de la combinaison entre ces deux structures est représenté en haut avec l'ifenprodil et le zinc liés à leur site. A droite : schéma représentant les NTDs de GluN1/GluN2B dans une conformation unique parmi les récepteurs iGluRs. De Furukawa, 2012.

Les NTDs des rNMDAs assurent également un rôle central dans la modulation allostérique des rNMDAs. La première preuve de cette régulation par les NTDs a été la découverte du site de haute affinité pour le zinc sur le NTD de GluN2A (Choi & Lipton, 1999 ; Fayyazuddin et al., 2000 ; Low et al., 2000 ; Paoletti et al., 2000). Il a ensuite été montré que les NTDs des rNMDAs contenaient les sites de liaison des principaux modulateurs allostériques connus : le zinc, les polyamines (par exemple la spermine) et l'ifenprodil, notamment (Fig. **2.7.B**). Ainsi, les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B possèdent des sites de liaison au zinc, d'affinité nanomolaire et micromolaire respectivement (Paoletti et al., 2000 ; Low et al., 2000 ; Choi et al., 1999 ; Rachline et al., 2005). Les études fonctionnelles sur GluN2A (Paoletti et al., 2000 ; Stroebel et al., 2011) et la structure cristallographique du NTD de GluN2B en complexe avec le zinc (Karakas et al., 2009), ont montré que, en interagissant avec des résidus des lobes supérieur (His 127 dans GluN2B et His 128 dans GluN2A) et inférieur (Glu 284 dans GluN2B, Asp 283 dans GluN2A), le zinc stabilisait une conformation fermée des NTDs (Fig. **2.18**).

L'ifenprodil, quant à lui, lie spécifiquement le NTD de la sous-unité GluN2B (Perin-Dureau et al., 2002 ; Ng et al., 2008 ; Han et al., 2008 ; Mony et al., 2009 ; Karakas et al., 2009 ; Hansen et al., 2010), avec une affinité plus de cent fois supérieure à celle avec laquelle il lie les sous-unités GluN2A, GluN2C et GluN2D. Alors que, jusqu'à présent, on pensait que l'ifenprodil se fixait au fond de la poche interlobes du NTD de GluN2B (Mony et al., 2009), la structure du dimère GluN1/GluN2B, cristallisé en présence d'ifenprodil et publiée en 2011 (Karakas et al., 2011 ; Fig. **2.18**) a révélé un mode de fixation de l'ifenprodil différent. En effet, il ne se fixe pas exclusivement dans la poche du NTD de GluN2B mais plutôt à l'interface entre les deux sous-unités GluN1 et GluN2B. Cette liaison de l'ifenprodil met en jeu des contacts entre les lobes supérieurs de GluN1 et GluN2B, et entre le lobe supérieur de GluN1 et le lobe inférieur de GluN2B. Cette structure confirme d'anciennes études qui avaient révélé l'importance de plusieurs résidus de GluN1, notamment GluN1-Y109, dans la liaison de l'ifenprodil (Masuko et al., 1999). Ce mécanisme de liaison de l'ifenprodil est confirmé par des expériences d'ultra-sédimentation qui mettent en évidence une stabilisation de l'assemblée hétérodimérique des domaines NTDs de GluN1 et GluN2B isolés vingt fois plus importante en présence d'ifenprodil (Karakas et al., 2011). Les polyamines, modulateurs allostériques positifs spécifiques des rNMDAs GluN1/GluN2B, se fixent aussi sur les NTDs. Des travaux récents suggèrent que, malgré leur activité allostérique opposée, ifenprodil et

spermine se lieent tous les deux à l'interface de dimérisation entre GluN1 et GluN2B (Karakas et al., 2011 ; Mony et al., 2011). Cependant, contrairement à l'ifenprodil, la spermine est supposée se fixer à l'interface des lobes inférieurs des NTDs de GluN1 et GluN2B (Fig. **2.16.B**). Les deux lobes se caractérisent par la présence de résidus chargés négativement. La liaison de la spermine neutralise ces charges négatives et stabilise ainsi un rapprochement des interfaces entre lobes inférieurs, ce qui permet de maintenir le NTD de GluN2B ouvert. Le NTD de GluN2B peut aussi lier des groupes d'ions Na^+ et Cl^- , qui, eux, se logent plus profondément dans la poche du NTD, que ce soit dans la conformation apo ou la conformation « zinc-lié ». La fonction des sites de liaison de ces ions est encore méconnue (Karakas et al., 2009).

Un modèle de régulation bidirectionnelle permet de décrire ces différents rôles des NTDs de rNMDA (Fig. **2.19** ; Gielen et al., 2008, 2009 ; Mony et al., 2011 ; Zhu et al., 2013). Ce modèle dépend en grande partie d'études fonctionnelles qui devront être validées par des études structurales. Dans ce nouveau modèle, les dimères de NTDs de GluN1/GluN2 oscillent spontanément (en absence de ligands) entre deux états conformationnels, "NTDs ouverts" (état activé) et "NTDs fermés" (état type désensibilisé) (Gielen et al., 2009). L'équilibre entre ces deux états varie selon la sous-unité GluN2 présente ; le NTD de GluN2A étant plus fréquemment ouvert que celui des sous-unités GluN2C ou GluN2D. Des variations dans cet équilibre entre conformations impliquent des différences importantes de probabilité d'ouverture entre les sous-types de rNMDAs. Par exemple, la probabilité d'ouverture d'un récepteur GluN1/GluNA est plus élevée car le NTD de GluN2A passe la majeure partie du temps dans un état ouvert, ce qui n'est pas le cas pour les récepteurs contenant GluN2B et surtout GluN2C, GluN2D. La stabilisation par le zinc et l'ifenprodil de la conformation "NTDs fermés", pour laquelle les lobes inférieurs sont séparés, introduit des contraintes sur les "linkers" reliant NTDs et ABDs et une séparation des ABDs qui, combinées à la fixation du H^+ sur son site, conduisent à la fermeture du canal ionique, comme cela se passe durant la désensibilisation des rAMPA et rKAs (Weston et al., 2006 ; Sun et al., 2002 ; Gielen et al., 2008). A contrario, la stabilisation de la conformation "NTDs ouverts" par les polyamines, pour laquelle les lobes inférieurs des NTDs de GluN1 et GluN2B sont maintenus proches l'un de l'autre, empêche de telles contraintes de s'exercer sur les ABDs, aboutissant à une stabilisation de l'état actif (i.e. canal ouvert) du récepteur.

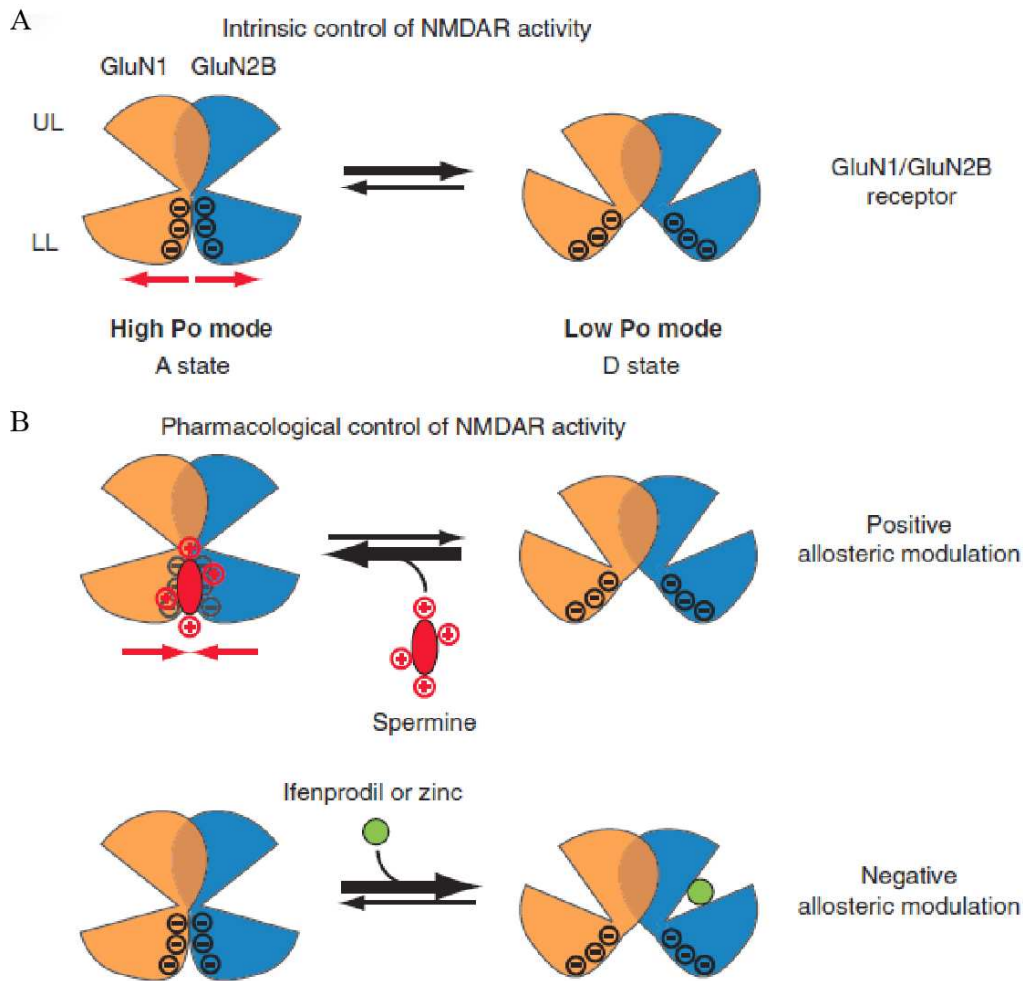


Figure 2.19. L'activité des récepteurs NDMA est régulée de façon bidirectionnelle via les domaines N-terminaux **A.** En absence de ligand, le NTD de GluN2 est capable d'osciller spontanément entre une conformation ouverte et fermée, cette dernière favorisant la fermeture du canal ionique. Les différences d'équilibre entre ces conformations sont responsables des différences de probabilité maximale d'ouverture observées dans chaque sous-type de récepteur. Les NTDs de GluN1 et de GluN2 sont supposés se fermer et s'ouvrir de façon concertée. Seul un dimère GluN1/GluN2 est représenté. **B.** La liaison d'agents pharmacologiques (ici la spermine (rouge) ou l'ifenprodil (vert) que un récepteur GluN1/GluN2B) modifie l'équilibre entre les conformations ouverte et fermée des NTDs : la spermine favorise la conformation ouverte des NTDs (canal ouvert) tandis que l'ifenprodil favorise une conformation fermée (canal fermé). *De Mony et al., 2009.*

Une étude menée récemment dans le laboratoire (Zhu et al., 2013) a permis d'identifier un nouveau mode de couplage entre sous-unités (couplage *trans*), au cours duquel les NTDs de GluN1 et GluN2 s'influencent réciproquement, la fermeture de l'un favorisant celle de l'autre. Ces travaux ont démontré, pour la première fois, l'implication du NTD de la sous-

unité GluN1 dans la communication allostérique entre le domaine NTD distal et la région dédiée au "gating" (ABD et pore). Les sous-unités GluN1 et GluN2 agissent ainsi de manière concertée dans les processus d'activation et de régulation des rNMDAs. Par ailleurs, le domaine NTD de la sous-unité GluN1 se caractérise par une grande flexibilité, associée à d'importants changements conformationnels (ouverture-fermeture, "twist-untwist"), essentiels au bon fonctionnement des rNMDAs.

2.2.5.5. Physio-pathologie des récepteurs NMDA

De nombreuses maladies neuropsychiatriques sont dites « de synapse » : il s'agit des synaptopathies. Une altération des fonctions des rNMDAs (notamment l'expression des sous-unités, le transport, la localisation et l'activité du récepteur) peut entraîner des désordres neuropsychiatriques importants. Ainsi, une hyperactivité (excès d'entrée de Ca^{2+} conduisant à la mort neuronale), aussi bien qu'une hypoactivité, des rNMDAs peut être délétère.

Accident vasculaire cérébral et épilepsie

La première implication des rNMDAs dans une maladie du SNC a été décrite pour les accidents vasculaires cérébraux (AVCs). En effet la mort neuronale qui y est associée met en cause les rNMDAs. Dans les conditions basales de transmission synaptique, l'activation des rNMDAs (surtout GluN1/GluN2A) stimule un complexe de signalisation de survie neuronale (Hardingham et al. 2002 ; Liu et al., 2007). Après une attaque cérébrale, causée le plus souvent par une ischémie, la concentration en glutamate extracellulaire augmente, entraînant une activation excitotoxique des rNMDAs extrasynaptiques (surtout GluN1/GluN2B) (Hardingham et al., 2002 ; Liu et al., 2007). Cette activité anormale des rNMDAs extrasynaptiques, en inhibant les agents de survie cellulaire et en activant des agents pro-apoptotiques comme la calpaïne, une protéase activée par le calcium (Xu et al., 2009), entraîne la mort cellulaire (Hardingham et al., 2002). Des antagonistes des rNMDAs, en limitant l'entrée de calcium excitotoxique, sont les premiers candidats pour une thérapie. Malheureusement, la plupart de ces drogues ont un intérêt limité car malgré leurs effets

neuroprotecteurs évidents, elles agissent de manière non spécifique sur la transmission synaptique normale et ont des effets secondaires intolérables (hallucinations, déficits respiratoires, troubles mnésiques etc...).

Maladie d'Alzheimer

L'activité des rNMDAs est le le facteur déclenchant majeur des phénomènes de plasticité synaptique dont la potentialisation à long-terme (ou LTP pour "long-term potentiation") qui caractérise la transmission synaptique dans les conditions physiologiques (Bennett, 2000). Le peptide bêta-amyloïde $A\beta$ inhibe la LTP initiée par les rNMDAs dans l'hippocampe (Yamin, 2009) par deux mécanismes. Tout d'abord, le peptide $A\beta$ fait décroître le nombre de rAMPAs et rNMDAs à la synapse, par des phénomènes d'endocytose des récepteurs synaptiques (Almeida, 2005 ; Snyder et al., 2005). Par ailleurs, le peptide $A\beta$ induit une entrée de calcium dans la cellule et donc une accumulation de calcium intracellulaire et un stress oxydatif. La production d'oxyradicaux dépend de la liaison du peptide $A\beta$ sur les rNMDAs dans les neurones de l'hippocampe (De Felice et al., 2007). Il s'agit d'un phénomène d'excitotoxicité par excès d'activation des rNMDAs (De Felice et al., 2007).

Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par la triade sémiologique : tremblements, akinésie, rigidité. Elle atteint essentiellement les neurones des formations pigmentées du tronc cérébral, et tout particulièrement les neurones dopaminergiques à l'origine de la voie nigro-striée, situés dans la *pars compacta* de la substance noire (Yan et al., 2011 ; Sgambato-Faure & Cenci, 2012). Cette dégénération des neurones dopaminergiques induit une hyperactivation des projections glutamatergiques vers le striatum et *in fine*, la perturbation de l'ensemble de la boucle impliquant thalamus, striatum et substance noire. Par ailleurs, on observe dans les neurones du striatum d'animaux atteints de dyskinésie et traités avec de la L-DOPA (1-3,4-dihydroxyphenylalanine), un renforcement de l'expression synaptique de la sous-unité GluN2A et une redistribution des rNMDAs contenant GluN2B, des régions synaptiques vers les régions extrasynaptiques (Hallett et al., 2005 ; Gardoni et al., 2006 ; Hallett & Brotchie, 2007). Trouver des composés thérapeutiques ciblant spécifiquement l'une ou l'autre des sous-unités serait très prometteur dans le traitement de la maladie de Parkinson. Par exemple, dans

des rats modèles, interférer spécifiquement avec la localisation synaptique de GluN2A conduit à une réduction du pourcentage de rat parkinsoniens développant des mouvements dyskinétiques (Gardoni et al., 2012).

Encéphalite anti-NMDA

Les anticorps dirigés contre les rNMDAs sont associés à certaines épilepsies chez les jeunes femmes (Niehusmann et al., 2009). La liaison des anticorps sur les rNMDAs réduit la densité de récepteurs à la surface des neurones de l'hippocampe (Fig. 2.20 ; Dalmau et al., 2011 ; Vincent et al., 2011). Ils interagissent sélectivement avec un épitope du domaine extracellulaire NTD de GluN1 (Dalmau et al., 2008). Cette diminution de la densité des rNMDAs est supposée inactiver préférentiellement les neurones GABAeriques, ce qui conduirait à la désinhibition des voies centrales excitatrices et finalement au syndrome fronto-striatal, qui est une caractéristique de cette forme d'encéphalopathie (Dalmau et al., 2011).

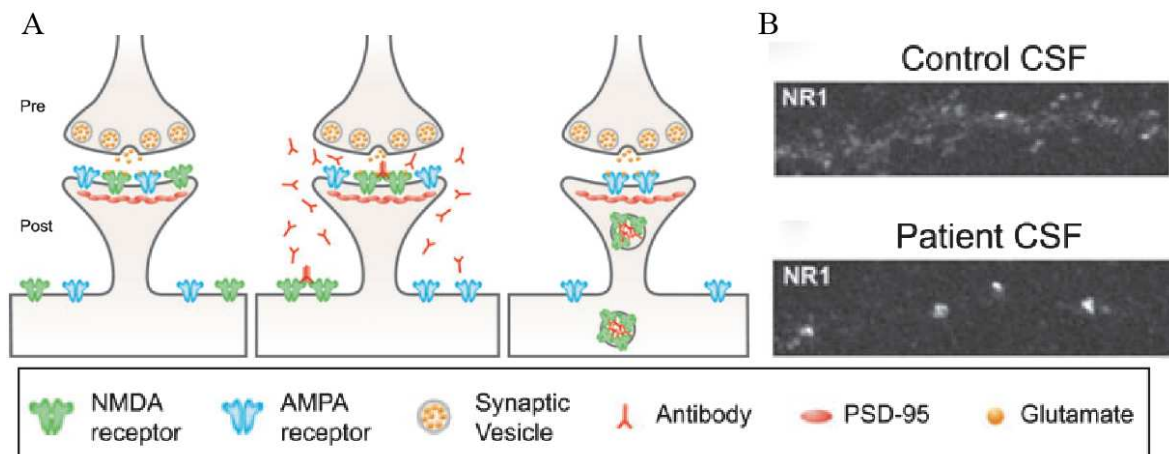


Figure 2.20. Mécanismes d'action des anticorps anti-récepteurs NMDA dans les encéphalites anti-NMDA. **A-** Représentation simplifiée de la synapse excitatrice avec des rAMPAs (bleu) et rNMDAs (vert) présents à la membrane post-synaptique et regroupés au sein de la densité post-synaptique. Les anticorps se fixent spécifiquement sur les rNMDAs post-synaptiques et extra-synaptiques, ce qui crée un pontage entre deux rNMDAs voisins. Ils sont alors internalisés, ce qui conduit à une diminution rapide des rNMDAs surfaciques. Les autres composants de la membrane post-synaptique, telles que les rAMPAs post-synaptiques, les protéines PSD-95 ou les terminaux présynaptiques, ne sont pas affectés. **B-** Des neurones de rongeur en culture dans du liquide cérébro-spinal (CSF pour "Cerebro-spinal fluid") contrôlé ou dans du CSF de patient atteint, sont observés par imagerie afin d'identifier les groupes de rNMDAs (« clusters ») à la membrane post-synaptique. *D'après Moscato et al., 2010.*

Douleur neuropathique

Il est à présent bien établi que les rNMDAs, et plus spécifiquement les récepteurs GluN1/GluN2B, jouent un rôle important dans l'initiation et le maintien des états de douleurs chroniques (douleurs inflammatoires et neuropathiques ; Wu & Zhuo, 2009). Les antagonistes à large spectre des rNMDAs ont montré des rôles analgésiques, mais ils ont été abandonnés à cause de leurs nombreux effets secondaires. L'expression des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B est particulièrement importante dans la corne dorsale de la moelle épinière et dans les régions centrales impliquées dans les voies de la douleur comme le thalamus et le cortex cingulaire antérieur (Watanabe et al., 1993 ; Monyer et al., 1994). Des études suggèrent de plus que les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B sont directement impliqués dans l'établissement de la douleur chronique, en particulier les récepteurs situés dans le cortex. Il a été montré en effet que des souris sur-exprimant la sous-unité GluN2B dans leur cerveau antérieur montraient une sensibilité plus importante à la douleur (Wei et al., 2001). Cibler sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B a donc un enjeu thérapeutique dans le traitement de la douleur. Effectivement, de nombreuses études ont montré que les antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B avaient des effets analgésiques dans des modèles animaux de douleur aiguë ou chronique, à des doses qui n'induisent pas de problèmes moteurs ou psychomimétiques (Boyce et al., 1999 ; Chizh et al., 2001 ; Qu et al., 2009).

Schizophrénie

La schizophrénie est une psychose chronique caractérisée par des fonctions mentales et des comportements anormaux (Lewis & Lieberman, 2000 ; Moghaddam & Javitt, 2012). Cette maladie se traduit par différentes manifestations cognitives et comportementales comprenant des symptômes "positifs" (hallucinations, troubles de la pensée), "négatifs" (apathie, repli sur soi) et "cognitifs" (troubles de l'attention et troubles de la mémoire) (Tsai & Coyle, 2002). Plusieurs études suggèrent qu'une sous-activation des rNMDAs est liée à l'établissement de la schizophrénie (Mohn et al., 1999 ; Belforte et al., 2010 ; Paoletti et al., 2013). Il a été montré que les bloqueurs du pore à large spectre des rNMDAs, tels que la kétamine et la phénylcyclidine (PCP), sont capables de provoquer les symptômes positifs, négatifs et cognitifs caractéristiques de la schizophrénie chez les humains (Tsai & Coyle, 2002). De plus, des souris transgéniques qui présentent une expression fortement réduite de la sous-unité GluN1 possèdent aussi ces symptômes (Mohn et al., 1999). Ces résultats indiquent donc

qu'augmenter l'activité des rNMDAs est une solution envisageable pour lutter contre la schizophrénie. L'activation directe des rNMDAs par des agonistes du site glutamate est difficilement concevable à cause de l'excitotoxicité que ces composés pourraient générer. Une des approches possibles pour augmenter l'activité des rNMDAs serait le développement de modulateurs allostériques positifs des rNMDAs. Certains neurostéroïdes, comme le sulfate de pregnenolone, qui potentient les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, ou les polyamines, qui potentient sélectivement les rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B (Mony et al., 2009), pourraient être de bons candidats. En effet, le développement de modulateurs partageant le site de liaison des polyamines pourrait présenter un intérêt dans le traitement de la schizophrénie car ils conduiraient à une potentiation sélective des rNMDAs contenant GluN2B, laissant les autres sous-types de rNMDAs fonctionnels. Cependant, comme indiqué ci-dessus, la sur-activation des récepteurs GluN1/GluN2B est impliquée dans l'excitotoxicité et la douleur. Il peut être donc dangereux de cibler spécifiquement cette sous-unité.

2.2.6. Architecture moléculaire et organisation modulaire des récepteurs-canaux du glutamate

2.2.6.1. Topologie membranaire et organisation modulaire

D'un point de vue topologique, les rNMDAs partagent, avec les autres iGluRs eucaryotes, une organisation modulaire typique, avec chaque sous-unité constituée de quatre modules, ou domaines, distincts (Mayer, 2006 ; Mayer, 2011a et 2011b ; Paoletti & Neyton, 2007 ; Paoletti et al., 2013) : (1) un domaine C-terminal (CTD) de taille variable, qui contient des sites de phosphorylation et de palmitoylation, et qui est impliqué dans le transport du récepteur, son ancrage à la membrane et son couplage à des complexes de signalisation ; (2) un domaine

transmembranaire (TMD) contenant le canal ionique et composé d'une boucle réentrante (ou « p-loop » ou M2) flanquée de trois hélices α transmembranaires (M1, M2, M3), M3 contenant le motif SYTANLAAF hautement conservé parmi les sous-unités d'iGluRs ; (3) un domaine de liaison des agonistes (ABDs, ~300 kDa) extracellulaires bilobés, interrompu par l'insertion du pore du canal ionique ; et (4) un deuxième domaine bilobé extracellulaire, le domaine N-terminal (NTD, ~380 kDa) connecté à l'ABD par un court segment polypeptidique appelé "linkers" (Fig 2.21).

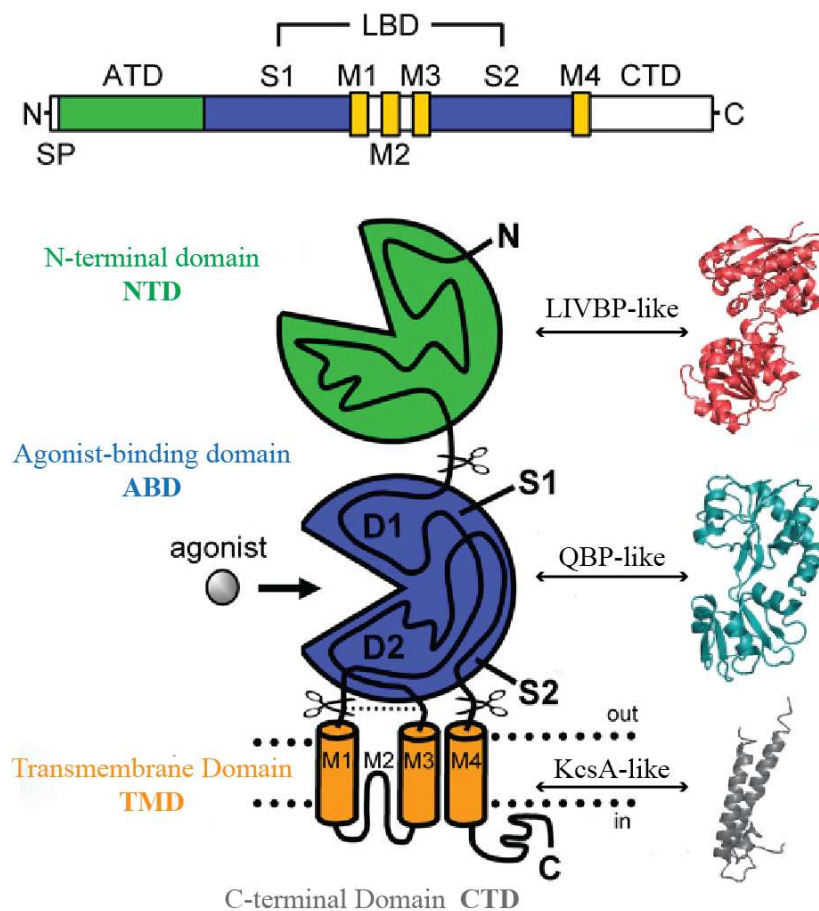


Figure 2.21. Topologie membranaire et organisation modulaire des sous-unités d'iGluRs. Représentation de la chaîne polypeptidique et illustration schématique de la topologie d'une sous-unité. L'iGluR a une structure modulaire composée des domaines NTD et ABD (extracellulaires), TMD (membranaire) et CTD (intracellulaire). L'ABD est défini par deux segments d'acides-aminés appelés S1 et S2 entre lesquels s'insère la séquence polypeptidique des segments M1-M3. Chaque domaine est homologue à une protéine membranaire dont la structure est représentée : le NTD est homologue à LIVBP (pdb 1Z15), l'ABD à la QBP (pdb 1GGG) et le pore au canal potassique KcsA (pdb 1BL8). *D'après Traynelis et al., 2010 et Paoletti, 2011.*

D'un point de vue structural, la partie transmembranaire (TMD), qui forme le canal ionique, présente une homologie de séquence avec certains canaux potassiques (Fig. 2.21 ; Mayer, 2006 ; Wollmuth & Sobolevsky, 2004). L'hypothèse d'une parenté structurale entre iGluRs et canaux potassiques a d'ailleurs été grandement renforcée par la découverte de GluR0, un canal potassique bactérien activé par le glutamate (Chen et al., 1999). La région extracellulaire est formée par un tandem de deux larges domaines bilobés, dits "clamshell-like" (en référence aux coquillages bivalves) ou encore "venus flytrap" (en référence aux plantes carnivores appelées dionées en français), qui présentent chacun des homologies avec une superfamille de protéines périplasmiques bactériennes (PBP) (Fig. 2.21 ; O-hara et al., 1993 ; Chen et al., 1999). L'ABD est homologue à la *glutamine binding protein* (QBP ou GlnBP) et le NTD, à la *leucine/isoleucine/valine binding protein* (LIVBP). Chaque domaine se comporte de façon semi-autonome (Perin-Dureau, 2002 ; Furukawa & Gouaux., 2003 ; Furukawa et al., 2005 ; Rachline et al., 2005 ; Karakas et al., 2009 ; Gielen et al., 2009 ; Yuan et al., 2009).

Domaines de liaison des agonistes (ABDs)

Le clonage des premières sous-unités d'iGluRs a permis de prédire leur structure secondaire qui fait apparaître, dans la région S1S2 formant l'ABD, une alternance de feuillets β et d'hélices α caractéristiques de la QBP (ou GlnBP ; O'Hara et al., 1993). Cette hypothèse a été étayée par la construction de chimères entre sous-unités d'iGluRs, suggérant que le domaine formé des segments S1 et S2 constituait l'ABD (Stern-Bach et al., 1994). De plus, les protéines périplasmiques bactériennes sont constituées de deux lobes formant une mâchoire, à l'intérieur de laquelle viennent se fixer les substrats. (Sun et al., 1998 ; Trakhanov et al., 2005). Or, les sites de liaison des agonistes des iGluRs ont été effectivement identifiés dans la crevasse interlobes des ABDs (Kuryatov et al., 1994; Laube et al., 1997).

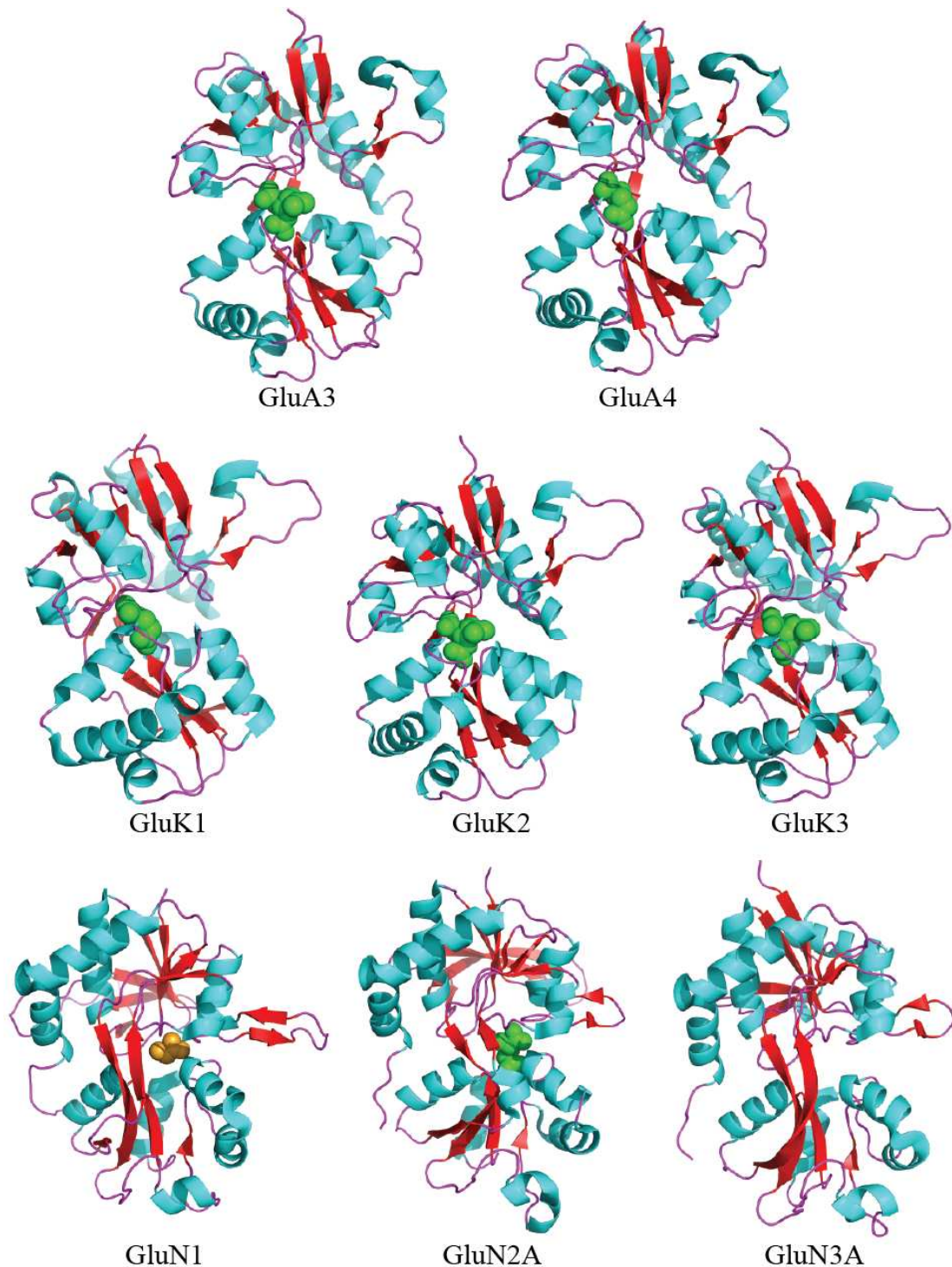


Figure 2.22. Structure des domaines de liaison des agonistes de différentes sous-unités iGluRs. Sont représentés les ABDs de GluA3 (pdb 4F39), GluA4 (pdb 3EPE), GluK1 (pdb 1TFX), GluK2 (pdb 1TT1), GluK3 (pdb 4E03), GluN1 (pdb 1PB7), GLuN2A (pdb 2A5S) et GluN3A (pdb 4KCD) Les ABDs d'iGluRs se présentent tous sous la forme d'un domaine bilobé (ou « clam-shell »), avec les lobes supérieur et inférieur délimitant une crevasse interlobes dans laquelle vient se loger l'agoniste, glutamate, kainate ou glycine (sauf GluN3A, forme apo). Les conformations de tous ces ABDs sont semblables.

Plus de 120 structures cristallographiques d'ABDs isolés de rAMPAs, rKAs et rNMDAs, en complexe avec des agonistes, agonistes partiels, antagonistes, ont permis d'établir définitivement que les ABDs des iGluRs adoptaient une conformation bilobée, très proche des protéines de type QBP (Fig. 2.22 ; Armstrong et al., 1998 ; Furukawa & Gouaux, 2003 ; Furukawa et al., 2005 ; Mayer, 2005 ; Yao et al., 2008 ; Mayer, 2006, 2011b ; Ahmed et al., 2009 ; Gill et al., 2008). Le ligand agoniste favorise une conformation fermée du domaine, qui est conservé au sein des protéines périplasmiques bactériennes et dans les iGluRs, même si la fermeture de l'ABD est d'amplitude plus faible que celle observée chez la QBP (Sun et al., 1998; Armstrong & Gouaux, 2000). L'ensemble des structures cristallographiques des ABDs constituent une mine d'informations structurales pour mieux comprendre les mécanismes de sélectivité des ligands et les liens entre les changements conformationnels induits par la liaison des agonistes et l'ouverture du canal ionique (Stawski et al., 2010, Pohlsgaard et al., 2011 ; Mayer, 2006). Les ABDs se montrent flexibles et dynamiques. C'est ce que confirment les mesures d'énergie libre de l'ABD de GluA2 dans sa forme apo ou glutamate-lié, qui révèlent notamment l'existence de multiples conformations apo d'énergies similaires (Lau et al., 2007). De même, il a été montré que les ABDs des sous-unités GluN1, GluN2A et GluN3A étaient extrêmement dynamiques puisqu'ils peuvent subir diverses transformations mises en évidence par des analyses en composantes principales (Yao et al., 2013). Il existe en réalité une vaste gamme de conformations pouvant les décrire, et non pas seulement une conformation "apo" et une autre "ligandée".

Les ABDs des iGluRs s'arrangent en paires associant deux sous-unités identiques (Fig.2.23.A) ou deux sous-unités distinctes (Fig. 2.23.B). Bien que des domaines ABDs isolés ne dimérisent pas en solution, le dimère d'ABDs constitue le dimère fonctionnel des iGluRs (Armstrong & Gouaux, 2000 ; Horning & Mayer, 2004 ; Sobolevsky et al., 2009 ; Mayer 2006, 2011a et 2011b). Il est stabilisé par une interface de dimérisation impliquant uniquement les lobes supérieurs des ABDs et majoritairement conservée parmi les iGluRs. Les lobes inférieurs des ABDs restent quant à eux libres de se mouvoir lors des opérations de "gating" du récepteur (Traynelis et al., 2010).

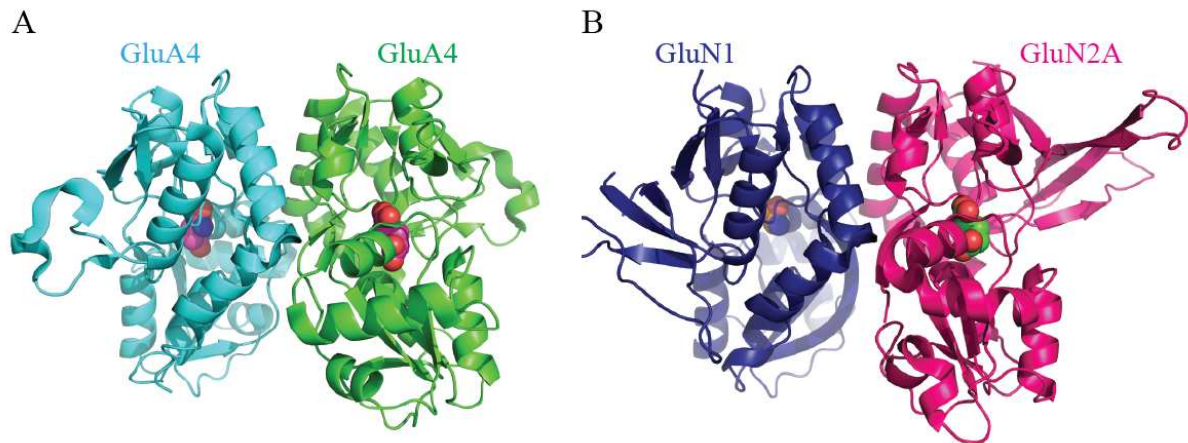


Figure 2.23. Structure de l'homodimère des domaines de liaison des agonistes du récepteur AMPA-GluA4 (A ; pdb 3EPE) et de l'hétérodimère de domaines de liaison des agonistes du récepteur NMDA GluN1/GluN2A (B ; pdb 2A5T). Les ABDs sont représentés en conformation fermée, complexé par le glutamate (ou la glycine pour GluN1).

Domaines N-terminaux (NTDs)

Dans les années 90, l'homologie de séquences entre le NTD des iGluRs et les protéines périplasmiques de type LIVBP (O'Hara et al., 1993), et également le domaine de liaison des agonistes des mGluRs, a été proposée. Ces domaines, chez les mGluRs, sont formés de deux lobes séparés par une crevasse qui constitue le site de liaison du glutamate (Kunishima et al., 2000). Les premières structures de NTDs d'iGluRs, celles des sous-unités GluA2 et GluK2 n'ont été cristallisées que tardivement (Fig. 2.25 ; Jin et al., 2009 ; Kumar et al., 2009). Les NTDs sont des domaines hautement divergents, que ce soit au sein des rNMDAs ou parmi les iGluRs (Traynelis et al., 2010). Par exemple, parmi les quatre sous-unités GluN2, les NTDs ne partagent que 19% d'identité de séquence, contrairement aux ABDs qui en partagent 63% et les TMDs 73% (Fig. 2.24).

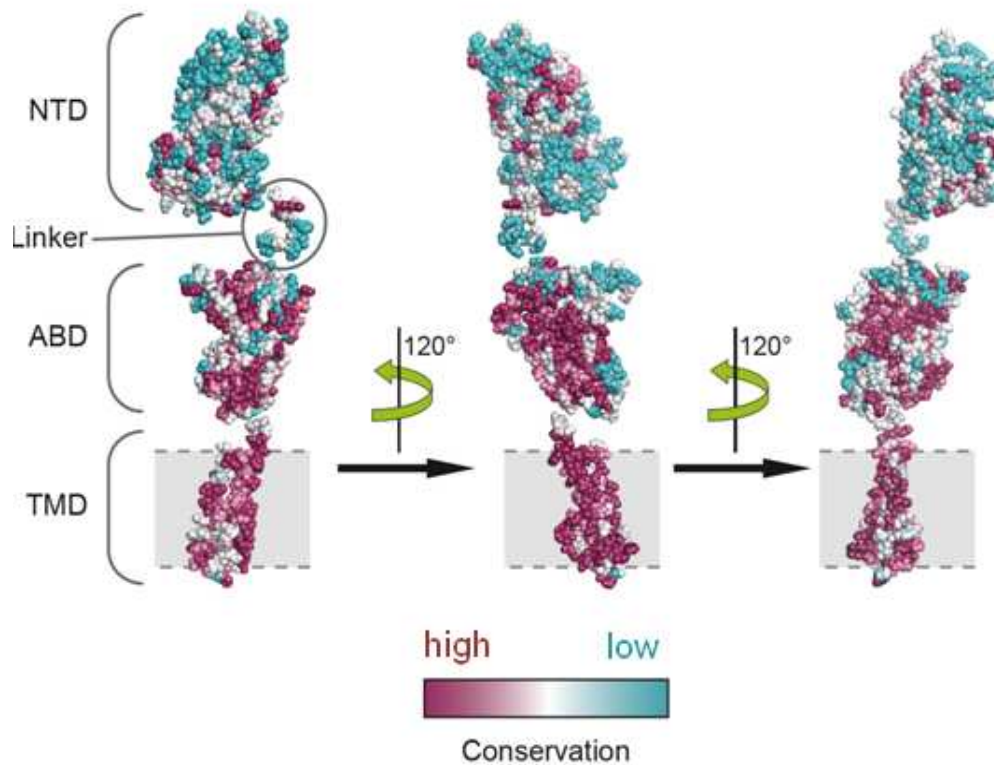


Figure 2.24. Conservation des acides-aminés entre les quatre sous-unités GluN2A-D d'un récepteur NMDA. L'échelle de couleur part du rose pour représenter les résidus très conservés au bleu pour indiquer les résidus très variables d'une sous-unité à l'autre. Contrairement aux TMDs et aux ABDs, les NTDs et les "linkers" les reliant aux ABDs sont des régions peu conservées. Parmi les quatre sous-unités GluN2, les NTDs ne partagent que 19% d'identité de séquence, contrairement aux ABDs qui en partagent 63% et les TMDs, 73%. *D'après Paoletti, 2011.*

Une caractéristique des structures des NTDs des rAMPAs et des rKAs est leur conformation partiellement fermée (Fig. 2.25). Dans la structure du NTD de GluK5, un site de glycosylation à l'entrée de la poche interlobes crée une gêne stérique qui justifie cette fermeture partielle du NTD. En revanche, rien de tel n'est observé dans les structures des autres NTDs d'iGluRs.

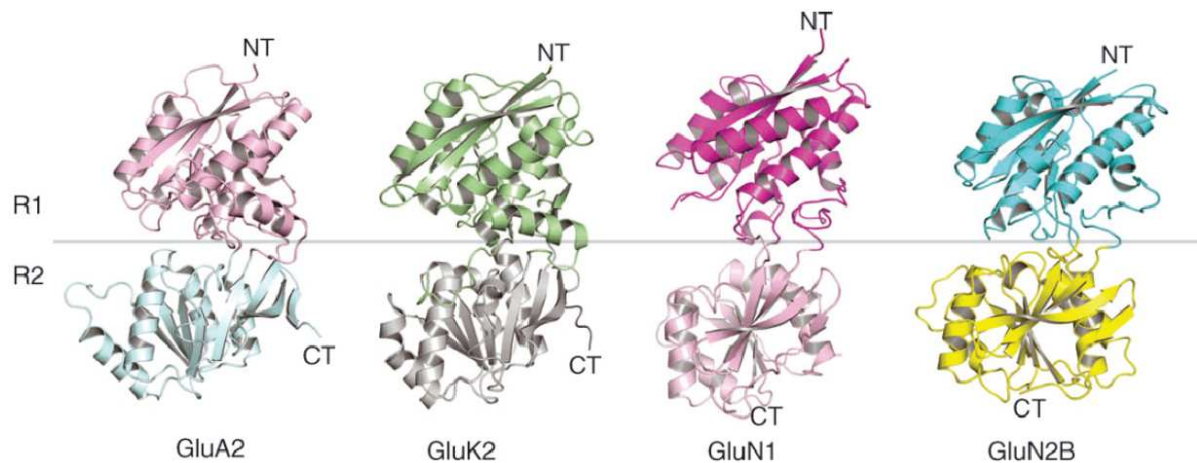


Figure 2.25. Structure des domaines N-terminaux de récepteurs-canaux du glutamate, AMPA (GluA2, pdb 3H5V), kainate (GluK2, pdb 3H6G) et NMDA (GluN1, pdb 3QEK, et GluN2B, pdb 3JPJ). Les NTDs d'iGluRs se présentent tous sous la forme d'un domaine bilobé (ou "clam-shell"), avec les lobes supérieur et inférieur délimitant une crevasse interlobes. *D'après Furukawa, 2012*

La première structure d'un NTD de rNMDA, celui de la sous-unité GluN2B, n'a été décrite que récemment (Fig 2.25 et 2.26 ; Karakas et al., 2009) et confirme la forme bilobée du NTD. Elle est cependant différente de celles des rAMPA et rKAs. En effet, le NTD de GluN2B adopte une conformation "twistée", avec une torsion de $\sim 45^\circ$ du lobe inférieur par rapport au lobe supérieur. Cette rotation, absente dans toutes les structures apparentées à la LIVBP, incluant les NTDs des rAMPA et rKAs (Clayton et al., 2009 ; Jin et al., 2009 ; Kumar et al., 2009), semble être conservée dans d'autres sous-unités de rNMDAs, notamment GluN2A (Stroebel et al., 2011) et GluN1 (Fig 2.25 ; Farina et al., 2011). De même que dans les rAMPA et rKAs, les NTDs de GluN1 et GluN2 adoptent une conformation partiellement fermée, dans laquelle la poche interlobes reste accessible aux solvants. La comparaison des structures d'un NTD monomérique de GluN2B, cristallisé dans sa forme apo (pdb 3JPW ; Karakas et al., 2009), en présence de zinc (pdb 3JPY ; Karakas et al., 2009) ou d'ifenprodil (pdb 3QEL ; Karakas et al., 2011) montre que la fixation du ligand (à l'entrée de la poche interlobes dans le cas du zinc, à l'interface entre les NTDs de GluN1 et GluN2B dans le cas de l'ifenprodil) n'induit pas de changements conformationnels, par rapport à la forme apo du NTD (Fig. 2.26). Les trois structures adoptent en effet une conformation fermée. Si cette conformation, dans l'état « zinc-lié » ou « ifenprodil-lié », est en accord avec le mécanisme

d'action des ligands du NTD (Gielen et al., 2009 ; Paoletti et al., 2000 ; Perin-Dureau et al., 2002 ; Rachline et al., 2005), elle est plutôt surprenante dans le cas de la forme non-ligandée du récepteur. Cependant, des arguments en faveur de fermetures spontanées des NTDs de GluN2 ont déjà été proposés (Fig. 2.19). La conformation observée dans le cas de GluN2B est en adéquation avec le fait que le NTD de GluN2B adopte préférentiellement un état fermé, ce qui est un déterminant essentiel de la faible probabilité d'ouverture du canal des rNMDAs contenant la sous-unité GluN2B (Gielen et al., 2009).

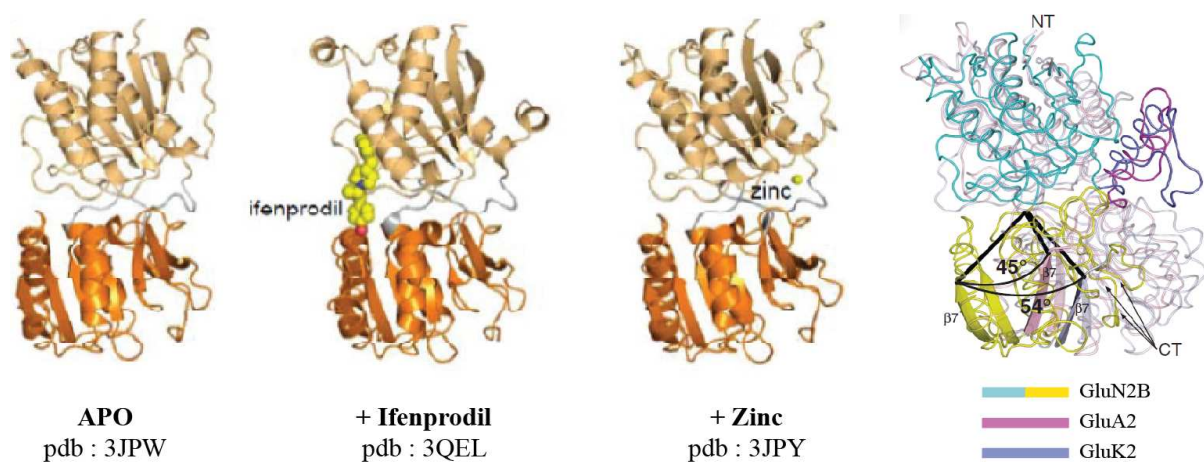


Figure 2.26. Les domaines bilobés des domaines N-terminaux de récepteurs NMDA adoptent une conformation « twistée ». Exemple avec le NTD de GluN2B. Les structures cristallographiques du NTD de GluN2B dans sa forme apo (pdb 3JPW), lié à l'ifenprodil (pdb 3QEL) et lié au zinc (pdb 3JPY) sont représentées. **A droite :** la superposition des lobes supérieurs des structures cristallographiques des NTDs de GluA2, GluK2 et GluN2B, illustre la grande différence d'orientation du lobe inférieur. Ce dernier subit une rotation de 45° et 54° par rapport aux lobes de GluA2 et GluK2 respectivement. *D'après Karakas et al., 2009.*

Les NTDs isolés en solution ont tendance à dimériser, avec une constante de dissociation K_d variant du nM au mM (Fig. 2.27 ; Jin et al., 2009 ; Kumar et al., 2009), contrairement aux ABDs qui restent principalement sous forme monomérique (constante de dissociation de dimère d'ABDs de l'ordre de 10 mM ; Kuusinen et al., 1999 ; Sun et al., 2002 ; Furukawa et al., 2005). Selon sa capacité à former des homomères, un NTD dimérise avec une plus ou moins grande affinité pour son partenaire. Ainsi, les NTDs de GluA2

s'associent facilement (faible K_d) contrairement aux NTDs de GluK5 ou GluN2 pour lesquels la constante de dissociation est beaucoup trop élevée pour envisager l'homodimérisation des NTDs. Au contraire, en présence de GluK2 pour GluK5 et GluN1 pour GluN2, l'hétérodimérisation est favorisée par des constantes de dissociation très faibles (Kumar et al., 2011; Karakas et al., 2011). Ces valeurs sont en adéquation avec les études de pontages disulfures menés sur les rKAs et rNMDAs, qui suggèrent la formation d'hétérodimères entre les NTDs de GluK2 et GluK5 et les NTDs de GluN1 et GluN2 (Kumar et al., 2011 ; Mony et al., 2011 ; Lee & Gouaux, 2011 ; Karakas et al., 2011). De même, pour les rAMPAs, les NTDs isolés des sous-unités GluA1, GluA2 et GluA4 forment facilement des homodimères, alors que le NTD de GluA3, qui homodimérise difficilement (K_d de l'ordre du micromolaire), forme un hétérodimère stable (K_d de l'ordre du nanomolaire) avec le celui de GluA2 (Rossman et al., 2011).

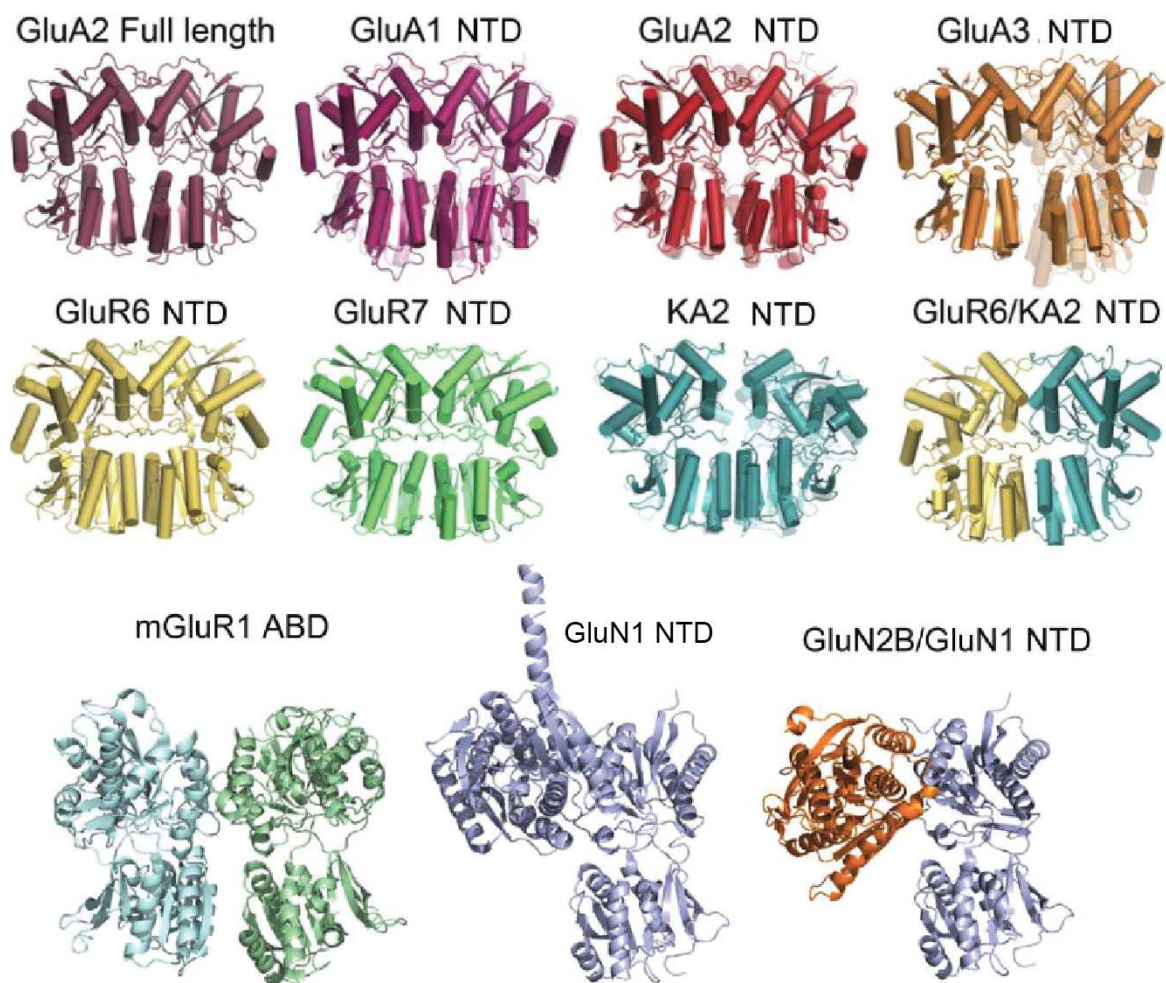


Figure 2.27. Assemblage dimérique des NTDs d'iGluRs. Sont représentées les structures cristallographiques d'homodimères NTDs de GluA2 (à partir du rAMPA-GluA2 entier, pdb 3KG2), GluA1 (pdb 3SAJ), GluA2 (pdb 2WJW, 3H5V, et 3HSY), GluA3 (pdb 3O21), GluK2 (pdb 3H6G), GluK3 (pdb 3OLZ), , GluK5 (pdb 3OM0 and 3OM1), et de l'hétérodimère NTDs de GluK2/GluK5 (pdb 3QLU). En troisième ligne, on retrouve la structure d'un dimère d'ABDs de mGluR1 (pdb 1EWK), d'un homodimère de NTDs GluN1 (pdb 3QEK) et d'un hétérodimère de NTDs GluN1/GluN2B (pdb 3QEL). *D'après Mayer, 2011a.*

Les structures cristallographiques des dimères de NTDs ont été résolues avec une précision allant jusqu'à 1.4 Å, pour les homodimères de GluA1 (Yao et al., 2011), GluA2 (Jin et al., 2009 ; Rossmann et al., 2011 ; Clayton et al., 2009), GluA3 (Sukumaran et al., 2011), GluA4 (Dutta et al., 2012), GluK2 (Kumar et al., 2009), GluK3 et GluK5 (Kumar & Mayer, 2010), et GluN1 (Karakas et al., 2011 ; Farina et al., 2011) ; et pour les hétérodimères de GluK2/GluK5 (Kumar et al., 2011) et GluN1/GluN2B (Karakas et al., 2011 ; Fig 2.28.B). Pour les rAMPAs et rKAs, la majorité de ces structures respectent une symétrie d'ordre deux, avec les lobes supérieurs et inférieurs qui participent équitablement à l'interface de dimérisation entre les deux NTDs. La dimérisation des NTDs de GluA2 et GluK2 se caractérise par trois régions d'interactions (Fig. 2.27. et 2.28. A) : (1) une boucle appelée flap, formant un bras qui s'étend entre les lobes supérieurs des deux NTDs adjacents et qui donne lieu à de nombreuses liaisons électrostatiques et polaires entre les deux protomères ; (2) deux hélices, α_2 et α_3 , qui forment une zone étendue de contacts hydrophobes et polaires entre les lobes supérieurs des deux NTD adjacents ; (3) l'hélice α_5 et le feuillet β_7 , à l'origine d'interactions hydrophobes entre les lobes inférieurs adjacents. Les deux premières régions sont bien conservées au sein de chaque famille d'iGluRs, mais très peu entre les familles, ce qui permet d'expliquer la spécificité de l'assemblage par famille d'iGluRs (Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). Parmi ces structures quelques variations existent malgré tout. Par exemple, certaines des multiples structures de l'homodimère GluA3 ont les lobes inférieurs séparés (Sukumaran et al., 2011), alors que dans la structure de l'homodimère GluK5, ce sont les lobes supérieurs qui sont légèrement distants (Kumar & Mayer., 2010). Pour l'hétérotétramère GluK2/GluK5, un dimère d'hétérodimères, structurellement proche du tétramère de NTDs observé pour le rAMPA-GluA2 entier, a été cristallisé (Fig. 2.33). Concernant les homodimères de NTDs de GluA2, GluK2 et GluK3, des opérations de symétrie dans la structure cristalline génèrent des assemblées tétramériques similaires (Kumar

et al., 2011 ; Jin et al., 2009 ; Clayton et al., 2009 ; Kumar et al., 2009 ; Kumar & Mayer, 2010).

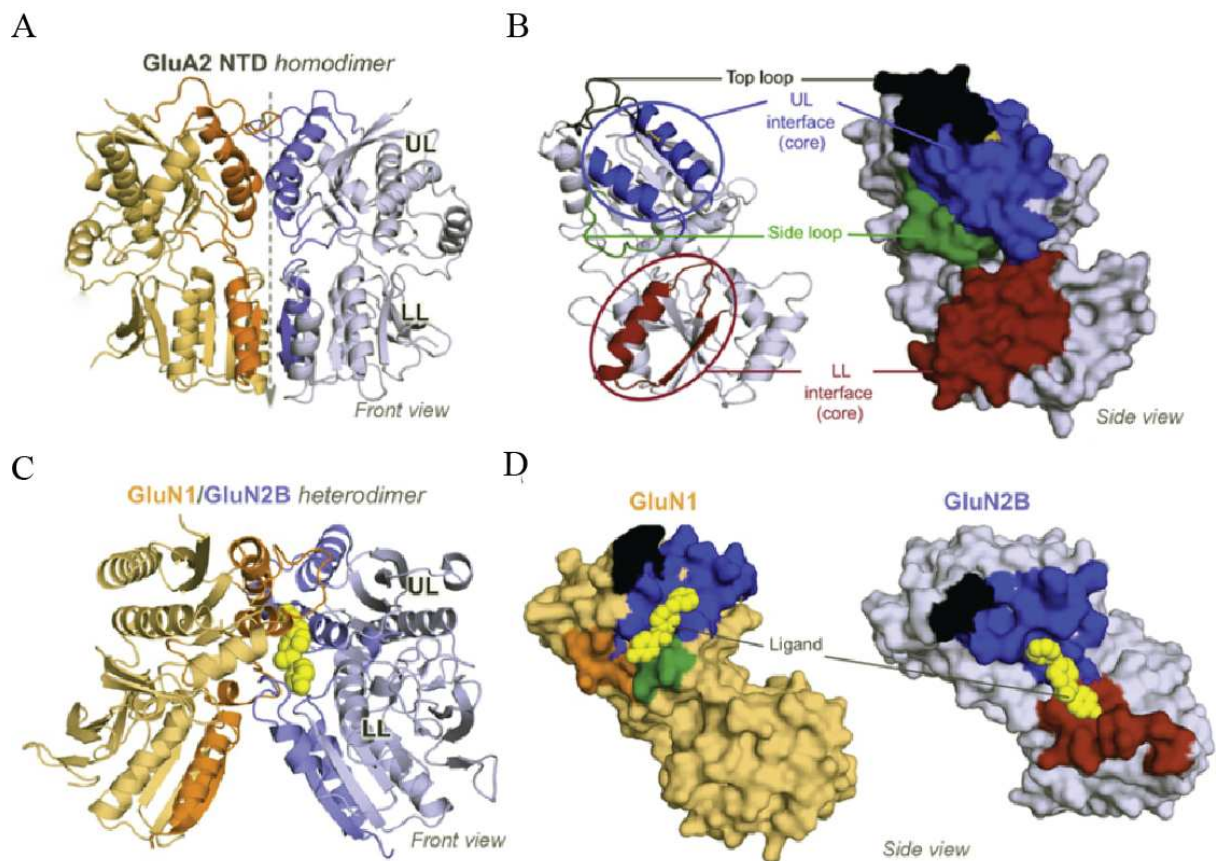


Figure 2.28. Les interfaces de dimérisation des domaines N-terminaux de récepteurs AMPA et NMDA n'impliquent pas les mêmes régions. (A et B) Les sous-unités GluA2 peuvent former des homodimères fonctionnels à la fois dans un récepteur entier et un récepteur isolé ($K_d=1.8$ nM). **A-** Dimère de NTDs GluA2 formant un ensemble symétrique stabilisé par des interactions entre les lobes supérieurs et inférieurs des deux sous-unités. **B-** Vue sur les éléments clés de l'interface de dimérisation des NTDs de GluA2, impliquant deux hélices (bleues) et une boucle (noire) dans les lobes supérieurs et une hélice et un feuillet (rouge) dans les lobes inférieurs. Une boucle supplémentaire (verte) est impliquée dans la dimérisation des NTDs de rKAs. (C et D) Les sous-unités GluN1 et GluN2B s'associent pour former un hétérodimère, moins favorable que le dimère de GluA2 ($K_d=1$ mM). **C-** Dimère de NTDs de GluN1/GluN2B formant un ensemble asymétrique stabilisé par des contacts impliquant le lobe supérieur de la sous-unité GluN1 et les deux lobes de la sous-unité GluN2B. **D-** Vue sur les éléments clés de l'interface de dimérisation des NTDs de GluN1 et GluN2B (même code couleur qu'en B), impliquant en plus une hélice supplémentaire (en orange). *D'après Herguedas et al., 2013*

Les structures cristallographiques des domaines NTDs isolés des sous-unités GluN1 et GluN2 sont particulièrement intéressantes car elles mettent en évidence des assemblées monomériques, dimériques et tétramériques, dont les conformations diffèrent fortement de celles observées dans les rAMPA et rKAs. Dans les trois structures de dimères de NTDs de GluN1 cristallisées, une d'ovocytes de *Xénope* et deux de rats, les contacts intermoléculaires concernent uniquement les lobes supérieurs des domaines NTDs bilobés (Fig. 2.27 ; Farina et al., 2011 ; Karakas et al., 2011). En raison du "twist" des lobes inférieurs de chaque protomère, par rapport à l'axe de symétrie du dimère, ce lobe inférieur n'est pas impliqué dans la dimérisation des NTDs. Dans la structure de l'hétérodimère de NTDs GluN1/GluN2B en revanche, l'interface est asymétrique et met en jeu des interactions à la fois entre les lobes supérieurs de GluN1 et GluN2B, et entre le lobe supérieur de GluN1 et le lobe inférieur de GluN2B (Fig. 2.28. C et D ; Karakas et al., 2011). Les interactions impliquées dans la dimérisation de ces deux dimères sont donc différentes. Dans l'homodimère GluN1, les hélices $\alpha 3$ des deux sous-unités sont en contact, tandis que les hélices $\alpha 2$ sont situées latéralement. Dans l'hétérodimère GluN1/GluN2B, les contacts sont assurés par des interactions entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ de GluN1 et les hélices $\alpha 1$ et $\alpha 2$ de GluN2B. En outre, une boucle connectant les feuillets $\beta 6$ et $\beta 7$ du lobe inférieur de GluN2B se projette à l'interface de dimérisation et établit des interactions polaires avec le lobe supérieur de la sous-unité GluN1 (via l'hélice $\alpha 10$). Cette interface constitue le site de liaison de l'ifenprodil. L'absence d'interaction entre les lobes inférieurs des NTDs autorise des mouvements conformationnels des NTDs, ce qui est essentiel pour la régulation allostérique des rNMDAs via les NTDs (Gielen et al., 2008 & 2009 ; Mony et al., 2011 ; Paoletti, 2011 ; Zhu et al., 2013). La structure cristallographique des NTDs de GluN1/GluN2B contient en réalité deux paires de dimères, qui forment un tétramère, avec l'interface de tétramérisation, entre les deux hétérodimères de NTDs, assurée par les sous-unités GluN2B. Si cet arrangement des sous-unités au niveau des NTDs est bien en accord avec la structure du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009), l'interface de tétramérisation est, elle, complètement différente de celle observée dans les rAMPAs (GluA2 ; Sobolevsky et al., 2009) et rKAs (GluK2/GluK5 ; Kumar & Mayer, 2010), puisqu'elle est formée par les lobes supérieurs, et non les lobes inférieurs, des NTDs de GluN2B. Sans information supplémentaire cependant, on ne peut déterminer si cet arrangement est celui de rNMDAs natifs ou bien s'il est présent seulement dans la structure cristalline. Malgré tout, étant donné les différences majeures observées dans les assemblées dimériques de NTDs, entre les rNMDAs d'une part et les rAMPAs et rKAs d'autre part, il est probable que le complexe tétramérique d'un rNMDA, formé par

l'arrangement de deux hétérodimères, soit substantiellement différent de celui du rAMPA-GluA2 cristallisé.

En effet, comme nous l'avons vu, les dimères de NTDs de rAMPAs et rKAs d'une part et ceux des NTD de rNMDAs d'autre part s'arrangent différemment. Les premiers forment des ensembles compacts, stabilisés par des interface entre lobes supérieurs et entre lobes inférieurs, et qui offrent peu de flexibilité conformationnelle. Le dimère de NTDs des rAMPAs et rKAs sert essentiellement de "briques" pour l'assemblage (voir Introduction **3.2**) (Fig. **2.28.A et B**). Dans le cas des rNMDAs, le dimère de NTDs est nettement moins rigide, notamment du fait de l'absence d'interfaces entre les lobes inférieurs. Cette grande flexibilité conformationnelle des NTDs joue un rôle crucial dans la régulation de l'activité du canal (voir plus haut, **2.2.5.4**) Récemment, des mesures de distances par LRET (Transfert d'énergie par résonance de luminescence) sur un récepteur GluN1/GluN2A entier ont suggéré que les quatre NTDs, dans un rNMDA tétramérique, était arrangés d'une manière moins compacte que ne le sont les NTDs du rAMPAs-GluA2 (Sirrieh et al., 2013).

Concernant les rAMPAs, le dimère de NTDs est décrit comme une structure rigide, pour laquelle il est difficile d'induire des changements conformationnels en réponse à la liaison de ligands. En particulier, les lobes inférieurs des NTDs ne sont pas libres de se mouvoir, tout du moins pas autant que ceux des rNMDAs lorsqu'ils se referment sur leur ligand. Tout du moins est-ce ce que suggèrent les conformations de NTDs observées dans des structures cristallographiques de NTDs de GluA3, les descriptions de densité électronique de la poche interlobes des NTDs de GluA2, ou encore les études récentes sur les modes normaux des iGluRs (Sukumaran et al., 2011). Pourtant, récemment, A.Dutta et ses collègues ont démontré, par des analyses de dynamiques moléculaires, que les NTDs monomériques des rAMPAs et des rNMDAs partagent des mouvements globaux similaires et que cette dynamique, si elle est plus restreinte au sein du dimère de NTDs, est toujours présente, dans une gamme variant d'une sous-unité à l'autre. Ainsi, les NTDs des rAMPAs seraient capables de changements conformationnels importants (Dutta et al., 2012). Dès lors se pose la question de l'éventuelle modulation des rAMPAs (et rKAs) par des ligands des NTDs. Récemment, de petites molécules et ions, présents en solution lors de la cristallisation des NTDs, ont été identifiées et semblent se fixer dans les poches interlobes des NTDs de GluA2 et de GluK2

(Sukumaran et al., 2011 ; Kumar et al., 2009). La structure la mieux résolue (1.75 Å) est celle d'un NTD de GluA2, cristallisé en présence de 200 mM de phosphate d'ammonium (pdb 3H5Y). Néanmoins, il n'est pas clair que la liaison de ces ions induisent des changements conformationnels ni qu'elle conduise à une modulation de l'activité du rAMPA.

Domaines transmembranaires (TMDs)

Dans les années 90, des similarités de séquence entre le canal des iGluRs et les canaux potassiques ont été mises en évidence (Wood et al., 1995; Kuner et al., 2003). Malheureusement, la faible identité de séquence (~ 20%) empêchait de pouvoir prédire la structure tridimensionnelle du canal des iGluRs. La découverte de GluR0, canal potassique bactérien activé par le glutamate (Chen et al., 1999) a marqué une grande avancée. GluR0 contient un domaine de liaison du glutamate semblable à celui des iGluRs eucaryotes, et un canal très proche de celui des canaux potassiques. Le canal des iGluRs adopterait en fait une organisation semblable à celle d'un canal potassique inversé dans la membrane (Fig 2.29.A ; Wollmuth & Sobolevsky, 2004).

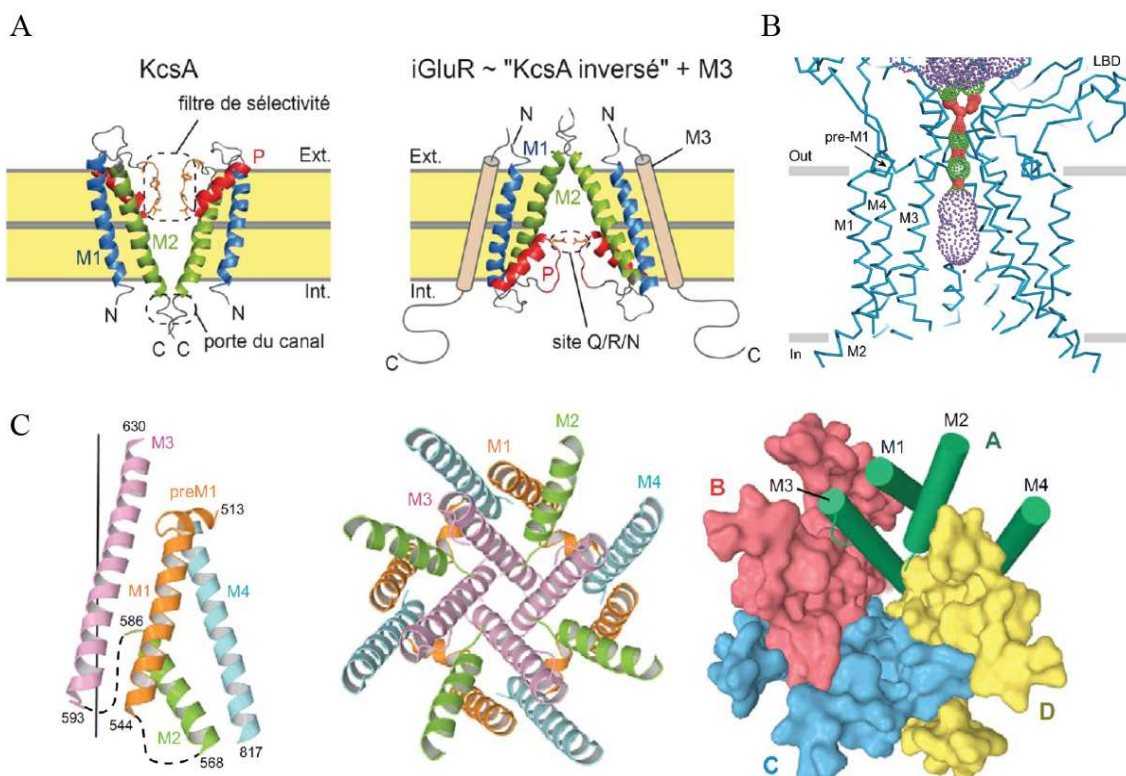


Figure 2.29. Arrangement du pore dans un récepteur-canal du glutamate. A- A gauche : structure cristallographique du canal de KcsA (pdb 1BL8), un canal potassique bactérien. Deux des quatre-sous-unités du KcsA, diamétralement opposées, sont représentées. **A droite** : "modèle" (validé par la structure du rAMPA-GluA2) de l'organisation membranaire du canal des iGluRs. Celui-ci adopterait une organisation semblable à celle des canaux potassiques mais avec une orientation inversée dans la membrane. **B-** Représentation du canal ionique de l'homotétramère GluA2 à partir de la structure de l'AMPA-GluA2 en "conformation pore fermé" et du diamètre du pore tout au long du canal (rouge < 1.4 Å < vert < 2.8 Å < violet). Les résidus les plus proches, formant la porte du canal dans l'état fermé inactif sont situés en haut du canal. *D'après Traynelis et al., 2010.* **C-** Structure cristallographique du canal ionique d'un rAMPA-GluA2 (à partir du pdb 3KG2). **A gauche** : les quatre segments membranaires d'une sous-unité, représentés dans un plan perpendiculaire à la membrane. **Au milieu** : vue de dessus du canal ionique formé par les quatre sous-unités GluA2. **A droite** : représentation surfacique du canal ionique du rAMPA-GluA2. *D'après Sobolevsky et al., 2009*

Le canal ionique d'un iGluR n'a été cristallisé que dans le cas du rAMPA homomérique GluA2 entier (Fig. 2.29.C). Le domaine transmembranaire de chaque sous-unité est constitué des trois hélices transmembranaires M1, M3 et M4 et d'une boucle rééminente M2 (ou "p-loop"), contenant une région C-terminale hélicale et une région N-terminale étendue qui longe le canal ionique. Une petite hélice pré-M1 entoure la portion extracellulaire du canal ionique, et sert de site de liaison pour des inhibiteurs non compétitifs (Balannik et al., 2005). Concernant le segment M2, qui définit les propriétés de perméabilité du canal et est donc un élément essentiel à la transduction du signal par le canal, il présente une organisation désordonnée dans la structure du rAMPA-GluA2. L'arrangement et la géométrie précis de ce segment M2, et du filtre de sélectivité du canal, restent donc à définir. L'entrecroisement des hélices M3, au niveau du motif conservé SYTANLAAF, constitue la portion la plus étroite du pore, avec les résidus Thr 617, Ala6 21 et Thr 625 qui bloquent le passage des ions à travers le canal, dans l'état fermé (Fig. 2.29.B). Cette région présente des homologies de structure avec les canaux potassiques et est considérée comme la porte d'activation du canal (Chang & Kuo, 2008 ; Moore et al., 2013). Il est fort probable que durant l'activation, les changements conformationnels subis par le canal ressemblent à l'ouverture en iris des canaux potassiques dont ils sont structurellement homologues.

2.2.6.2 Arrangement tétramérique des iGluRs

Initialement, les iGluRs étaient supposés former des pentamères, par analogie avec les récepteurs-canaux de la famille cys-loop. Cette hypothèse a été rapidement remise en question et l'organisation tétramérique des iGluRs est aujourd'hui indiscutable. En effet, des analyses de microscopie électronique, donnant des informations sur la taille des complexes et l'axe de symétrie (Nakagawa et al., 2005), des expériences de photo-blanchiment, sur des récepteurs dont chaque sous-unité est fusionnée à un GFP, et des études cristallographiques montrant que les ABDs forment des entités dimériques et que le récepteur complet agit sous forme de dimère de dimères (Clayton et al., 2009 ; Jin et al., 2009 ; Kumar & Mayer, 2010 ; Sukumaran et al., 2011), sont autant d'arguments en faveur de l'organisation tétramérique des iGluRs. La description récente de la structure atomique d'un rAMPA entier (récepteur homotétramérique du rat, GluA2, privé de la région C-terminale ; Sobolevsky et al., 2009 ; Fig. 2.30) confirme cet arrangement en dimère de dimères et fournit en plus des informations précieuses concernant l'arrangement relatif des quatre sous-unités dans un récepteur tétramérique entier. Cette structure obtenue en présence d'un antagoniste compétitif des rAMPAs, et dont la résolution n'est que de 3.6 Å, a été affinée grâce aux structures de haute résolution des domaines isolés NTD (pdb 3H5V, 2.3 Å) et ABD (pdb 1FTL, 1.8 Å).

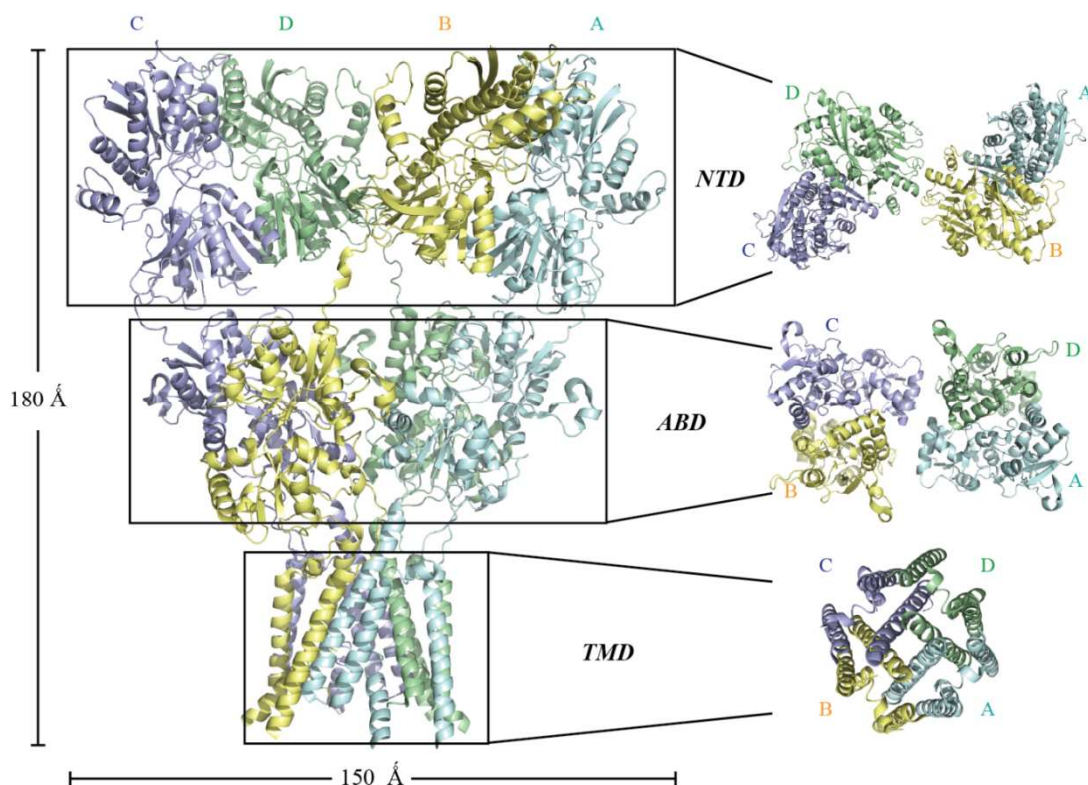


Figure 2.30. Structure et arrangement du récepteur AMPA homomérique GluA2 entier. Architecture globale du rAMPA-GluA2 de rat cristallisé en conformation « pore fermé » (présence d'un antagoniste compétitif dans la poche interlobes des ABDs de GluA2 ; *Sobolevsky et al., 2009*). Vue parallèle au plan de la membrane. La structure du rAMPA est divisée en trois couches indépendantes : les NTDs, les ABDs, et les TMDs (le récepteur est privé de sa partie C-terminale). Les quatre protomères sont désignés par les lettres A, B, C, D, et représentés respectivement en bleu, violet, jaune et vert. Dans la couche des NTDs, les sous-unités B et D occupent une position proximale par rapport à l'axe de symétrie d'ordre 2 de la couche des NTDs, alors qu'au niveau des NTDs, ce sont les sous-unités A et C qui contribuent à l'interface entre les deux dimères. Dans la région du pore, les quatre sous-unités s'arrangent symétriquement autour du pore (symétrie d'ordre quatre).

La structure du rAMPA-GluA2 révèle une organisation étonnante du récepteur en trois couches distinctes établissant peu de contacts entre elles (*Sobolevsky et al., 2009*) : le domaine transmembranaire formant le canal ionique, au-dessus les NTDs, et entre les deux, la couche des ABDs. A l'extrémité N-terminale, les quatre NTDs s'arrangent en deux dimères, chaque dimère étant constitué de l'apposition de deux NTDs voisins. En adéquation avec le rôle central des NTDs dans la reconnaissance et l'assemblage des sous-unités (*Hansen et al., 2010*), chaque dimère de NTDs se caractérise par de nombreux contacts impliquant des résidus des deux lobes de chaque sous-unité et couvrant une surface d'environ 1400 \AA^2 (Fig. 2.30 et 2.31). L'interface de dimérisation des lobes supérieurs de ces NTDs est semblable à celle décrite pour les domaines de liaison des agonistes des récepteurs métabotropiques du glutamate (qui s'apparentent également à la protéine périplasmique bactérienne LIVBP; *Kunishima et al., 2000*). Les deux dimères de NTDs interagissent également via des contacts, moins nombreux qu'au sein du dimère (surface d'environ 330 \AA^2), faisant intervenir des résidus des lobes inférieurs des NTDs des sous-unités les plus centrales (diagonalement opposées). Au niveau des ABDs, chaque domaine est apposé dos-à-dos à son partenaire, cette dimérisation faisant intervenir uniquement les lobes supérieurs des ABDs (surface couverte d'environ 900 \AA^2). Les deux dimères d'ABDs interagissent à leur tour au niveau de "l'interface de tétramérisation" (environ 220 \AA^2) située sur l'axe de symétrie du récepteur et impliquant les lobes inférieurs des ABDs. Le pore s'apparente quant à lui à un canal potassique inversé, caractérisé par une symétrie d'ordre quatre. Les hélices transmembranaires M1 et M4, en périphérie du canal, constituent la partie lipidique et exposée du canal ionique, le segment M4 de chaque sous-unité étant accolé aux segments M1 et M3 de la sous-unité adjacente. Une hélice pré-M1, parallèle au plan de la membrane, entoure l'extérieur du canal

ionique. L'ensemble formé par les hélices M3 des quatre sous-unités autour de l'axe de symétrie longe le canal et l'entrecroisement des hélices M3 dans la région "haute" du canal (côté extracellulaire) constitue une barrière au passage des ions ; c'est la "porte d'activation".

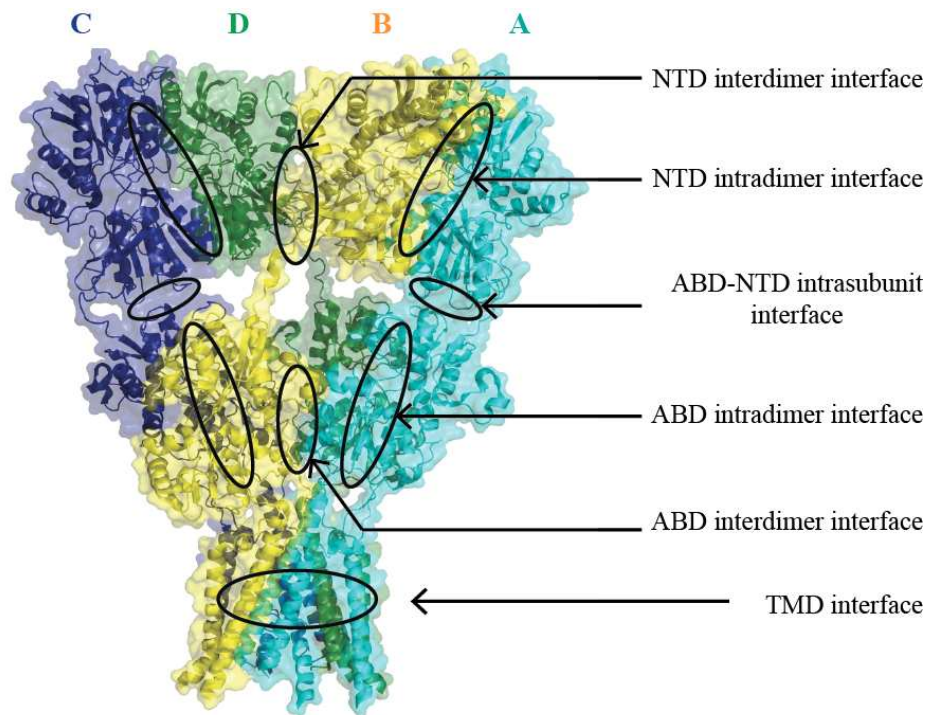


Figure 2.31- Interfaces intra- et inter- sous-unités dans le récepteur AMPA-GluA2. Les interfaces de dimérisation, entre ABDs ou entre NTDs (interface intradimère), les interfaces de tétramérisation, entre dimères d'ABDs ou entre dimères de NTDs (interface interdimères) et les interfaces entre domaines transmembranaires sont entourées sur la structure. *D'après Sobolevsky, 2013.*

La caractéristique la plus frappante révélée par la structure du rAMPA-GluA2 est la présence de l'échange de domaines ou "domain swapping" : les deux sous-unités qui forment un dimère dans la couche des NTDs ne sont plus associées au niveau des ABDs (Fig. 2.32 ; voir également Fig. 2.30). En d'autres termes, les sous-unités changent de partenaire d'une couche à l'autre. La conséquence de cette permutation est la non-équivalence structurale des quatre sous-unités, bien qu'elles aient la même séquence en acides-aminés. Le rAMPA-GluA2 est donc constitué de deux paires de sous-unités (A et C d'une part, B et D d'autre part) de

conformations différentes (Fig. **2.30**). Les différences de structure entre les sous-unités A/C d'une part et B/D d'autre part sont principalement localisées au niveau des "linkers" connectant les NTDs aux ABDs et les ABDs aux TMDs. En effet, dans chacune des quatre sous-unités du tétramère AMPA, les ABDs (280 résidus) sont reliés aux NTDs (380 acides-aminés) et aux TMDs (120 résidus) par de petits "linkers" polypeptidiques. Ces "linkers" sont les éléments de la structure qui reflètent le mieux son asymétrie puisqu'ils adoptent dans cette structure deux conformations différentes selon la sous-unité, A/C ou B/D. Au niveau des domaines extracellulaires, la permutation des sous-unités entre les couches d'ABDs et de NTDs génère une large cavité dans la partie extracellulaire du récepteur, avec les NTDs des protomères A et C qui établissent d'importants contacts avec les ABDs (surface cachée 460 Å²), contrairement aux protomères B et D. On peut noter que les "linkers", qui assurent la transition entre ABDs et NTDs, ont été raccourcis de six acides-aminés dans la construction ayant servi à établir la structure cristallographique. L'ensemble formé par les NTDs et les ABDs est donc probablement encore moins compact que ce que la structure du rAMPA-GluA2 ne le suggère. Au niveau du pore, des "linkers" connectent les hélices α transmembranaires avec l'ABD et assurent ainsi la transition entre la symétrie d'ordre quatre du canal ionique et la symétrie d'ordre deux des domaines extracellulaires. En particulier, au dessus du motif conservé SYTANLAAf, les hélices M3 des sous-unités A et C sont prolongées par un tour d'hélice supplémentaire, par rapport à celles des sous-unités B et D. L'asymétrie observée dans le rAMPA-GluA2 a de profondes conséquences sur les mécanismes d'activation du récepteur, car les différentes conformations adoptées par les paires de sous-unités A/C et B/D jouent sur leur implication dans l'activation du canal ionique (voir Résultats **1.3**).

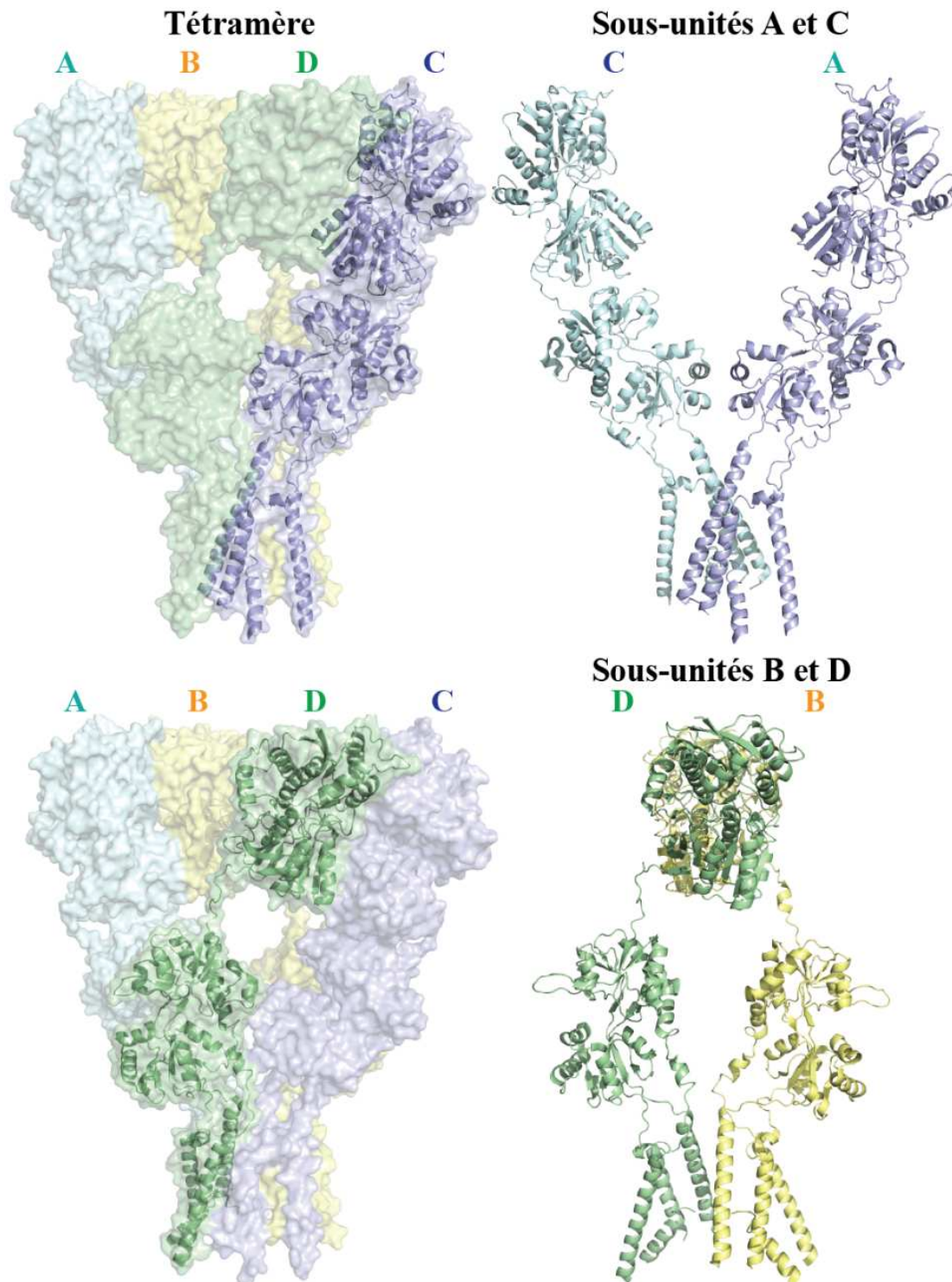


Figure 2.32. « Domain swapping » : l'asymétrie remarquable du récepteur AMPA homotétramérique GluA2 (Sobolevsky et al., 2009). Les quatre sous-unités chimiquement identiques n'adoptent pas la même conformation. Deux conformations non-équivalentes existent : l'une représentée par les sous-unités A (bleu) et C (violet) (paire A/C) et l'autre caractérisant les sous-unités B (jaune) et D (vert) (paire B/D).

Cette architecture d'ensemble est vraisemblablement conservée dans les autres familles d'iGluRs. Tel est le cas pour les récepteurs kainate pour lesquels la permutation des sous-unités semble être présente (Das et al., 2010 ; Lee et al., 2011 ; Schauder et al., 2013). Actuellement, seulement une structure tétramérique de NTDs d'un rKA a été résolue : il s'agit des NTDs d'un rKA hétéromérique GluK2/GluK5 (Fig. **2.33.B**). L'arrangement des sous-unités GluK2 et GluK5 dans le tétramère, au niveau des NTDs, est semblable à celui observé dans un rAMPA GluA2 homomérique entier, avec les sous-unités GluK2 internes et GluK5 externes par rapport à l'axe de symétrie. Ainsi, ce sont les lobes inférieurs des sous-unités GluK2 qui forment l'interface de tétramérisation des NTDs dans un rKA hétéromérique (Kumar et al., 2011). Concernant les rNMDAs, qui sont obligatoirement des hétéromères, la situation est plus complexe. Etant donné que toutes les sous-unités d'iGluRs partagent une organisation commune, il est très probable que l'organisation par couches décrite pour le rAMPA-GluA2 soit conservée dans les rNMDAs. A contrario, des différences plus ou moins importantes sont attendues au sein de chaque couche. En particulier, la configuration "twistée" des NTDs des sous-unités GluN2 (Karakas et al., 2009 ; Stroebel et al., 2011) contraint les NTDs à dimériser différemment de ce qui est observé chez les rAMPAs. Cette différence d'assemblage au niveau des dimères de NTDs se répercute sur l'arrangement des deux dimères de NTDs au sein du tétramère : "l'interface de tétramérisation" des NTDs d'un rNMDA est donc très probablement unique parmi les iGluRs (Fig. **2.33.C** ; Karakas et al., 2011) et s'accorde avec le rôle unique de régulation allostérique des NTDs des rNMDAs (Paoletti, 2011).

Contrairement au "cas NTDs", l'hétérodimère d'ABDs de GluN1/GluN2A (Furukawa et al., 2005) est superposable avec le dimère d'ABDs du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009). S'il est maintenant admis que l'unité fonctionnelle d'un rNMDA hétéromérique GluN1/GluN2 est un hétérodimère (Furukawa et al., 2005 ; Gielen et al., 2009), plusieurs hypothèses sont défendues concernant l'arrangement des quatre sous-unités (typiquement deux GluN1 et deux GluN2) autour du pore central (voir Résultats **1.1.3 et 1.3.2**). Au sein du complexe tétramérique, les interactions entre les ABDs des iGluRs sont relativement faibles et il est probable qu'elles ne jouent qu'un rôle mineur dans l'initiation de l'assemblage du récepteur. En revanche, elles sont supposées être fortement impliquées dans les fonctions du récepteur, son activation, sa désactivation et sa désensibilisation (Chaudhry et al., 2009a, 2009b ; Nayeem et al., 2009 ; Sun et al., 2002 ; Weston et al., 2006b). La dynamique de la

structure formée par les quatre ABDs, ainsi que la flexibilité des domaines individuels, révélés par des expériences d'électrophysiologie (Plested & Mayer, 2009), de fluorescence (FRET ; Landes et al., 2011), et de modélisation de dynamiques moléculaires (Dong & Zhou, 2011), sont à l'origine de changements conformationnels importants, qui accompagnent probablement les différentes phases de l'activité du récepteur (voir aussi : Lau & Roux, 2011 ; Schauder et al., 2013).

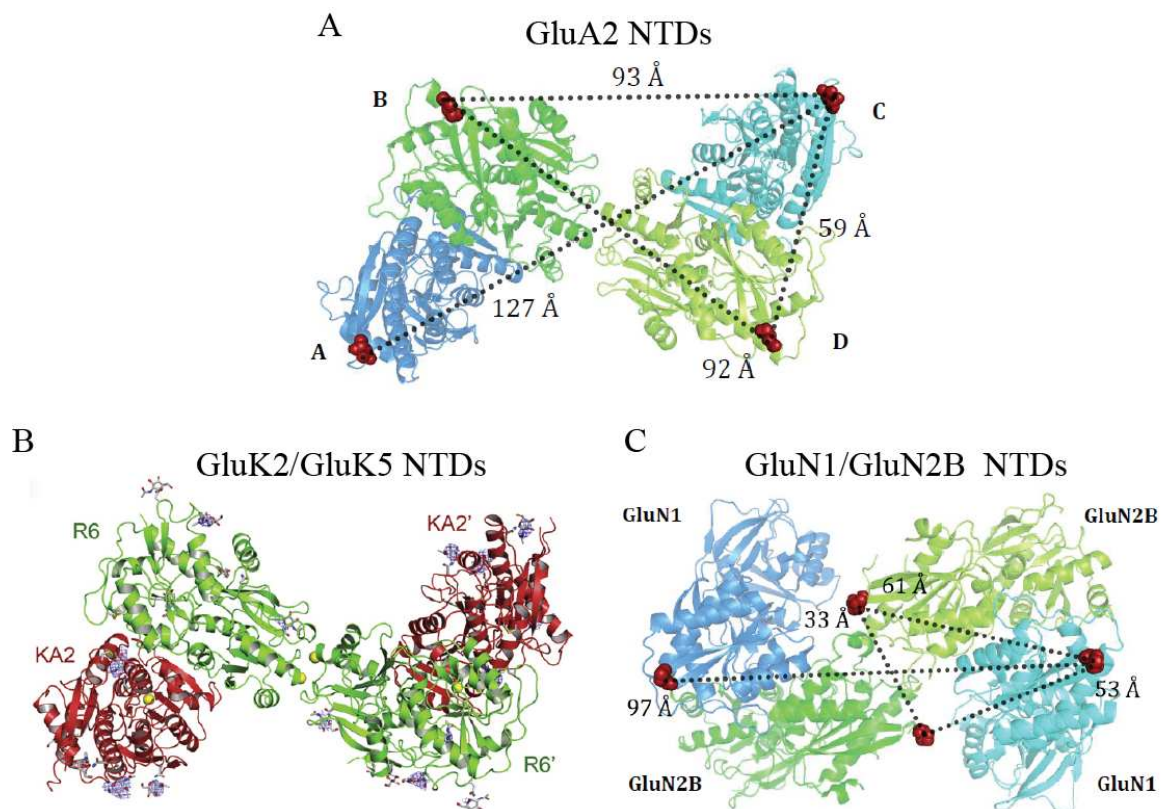


Figure 2.33. Comparaison des structures cristallographiques de tétramères de domaines N-terminaux de récepteurs AMPA, kainate et NMDA. **A-** Structure du tétramère de NTDs du rAMPA-GluA2 cristallisé en entier (pdb 3KG2 ; Sobolevsky et al., 2009). Les sous-unités B et D, en vert, sont les sous-unités proximales par rapport à l'axe de symétrie du tétramère de NTDs, et les sous-unités A et C, en rouge, les sous-unités distales. L'interface de tétramérisation fait intervenir les lobes inférieurs des NTDs des sous-unités B et D. **B-** Structure du tétramère de NTDs du rKA-GluK2/GluK5 (pdb 3QLV ; Kumar & Mayer, 2010). Les sous-unités GluK2, en vert, sont les sous-unités proximales par rapport à l'axe de symétrie du tétramère de NTDs, et les sous-unités GluK5, en rouge, les sous-unités distales. L'interface de tétramérisation fait intervenir les lobes inférieurs des NTDs de GluK2. **C-** Structure du tétramère de NTDs du rNMDA-GluN1/GluN2B (pdb 3QEL ; Karakas et al., 2011). Les sous-unités GluN2B, en vert, sont les sous-unités proximales par rapport à l'axe de symétrie du tétramère de NTDs, et les sous-unités GluN1, en rouge, les sous-unités distales. L'interface de tétramérisation fait intervenir les lobes supérieurs des NTDs de GluN2B.

2.2.7. Mécanismes structuraux d'activation

Le terme de « gating » réfère à une série de changements conformationnels qui interviennent dans un iGluR et qui relie la liaison/dissociation de ligands à l'ouverture/fermeture du canal ionique. Nos connaissances de ces mécanismes proviennent essentiellement d'études structurales et fonctionnelles menées sur les rAMPA et rKAs (Armstrong & Gouaux, 2000; Erreger et al., 2004 ; Mayer, 2006 ; Hansen et al., 2007). Notamment, des mesures de courant sur cellules entières en réponse à l'application de glutamate révèlent trois processus de « gating » apparents (Fig. 2.34.A) : l'activation, la désensibilisation et la désactivation, qui font respectivement passer un iGluR de l'état fermé à ouvert, ouvert à désensibilisé puis ouvert/désensibilisé à un état fermé (Fig. 2.34.B). En réalité, des analyses détaillées de courant ont révélé une multitude d'autres conformations de "gating" et de transitions entre ces conformations (Vance et al., 2013).

L'activation d'un iGluR implique les ABDs et les domaines transmembranaires, alors que les NTDs et CTDs ne sont pas indispensables au processus (Vissel et al., 2001 ; Rachline et al., 2005 ; Mayer, 2004 ; Paoletti, 2011). Ainsi, l'ouverture du canal ionique d'un iGluR, est déclenchée par la liaison de l'agoniste dans la crevasse interlobes de chaque ABD. La description moléculaire des poches de liaison des agonistes a permis de disséquer les éléments structuraux responsables de la liaison du glutamate. L'étude approfondie de la sous-unité AMPA-GluA2 indique que de nombreuses liaisons hydrogènes et ioniques sont formées entre le glutamate et des résidus des lobes inférieurs et supérieurs (Armstrong & Gouaux, 2000). L'arginine 485, très conservée au sein des iGluRs, sert notamment de point d'ancrage aux agonistes *via* une liaison ionique avec leur groupement carboxylate. Dans la sous-unité GluN1, qui lie la glycine et la D-sérine, mais pas le glutamate, la leucine 704 de GluA2 est remplacée par le tryptophane 731. La chaîne latérale de ce résidu aromatique induit une gêne stérique importante et empêche la fixation du glutamate, mais autorise celle de glycine, qui est le plus petit des acides aminés (Furukawa & Gouaux, 2003). Les rAMPA ont une affinité pour le glutamate nettement plus faible que celle des rNMDAs, les rKAs ayant une affinité intermédiaire (Attwell & Gibb, 2005). Les poches de liaison du glutamate des sous-unités GluA2, GluK2 et GluN2A sont pourtant très similaires. Les différentes affinités semblent résulter d'interactions directes entre lobes supérieur et inférieur, dans les régions qui bordent

la crevasse interlobes des ABDs, régions qui sont peu conservées d'une famille d'iGluRs à l'autre. Dans le cas des rKAs de type GluK2, un réseau de liaisons ioniques et hydrogènes entre résidus des deux lobes stabilise la conformation fermée de l'ABD dans laquelle le glutamate se trouve retenu, et tend donc à empêcher sa dissociation (Mayer, 2005 ; Chaudhry et al., 2009b). L'absence de ces interactions dans le cas des récepteurs AMPA-GluA2 facilite la dissociation du glutamate, ce qui pourrait expliquer leur moins bonne affinité pour ce dernier (Weston et al., 2006 ; Ahmed et al., 2013)

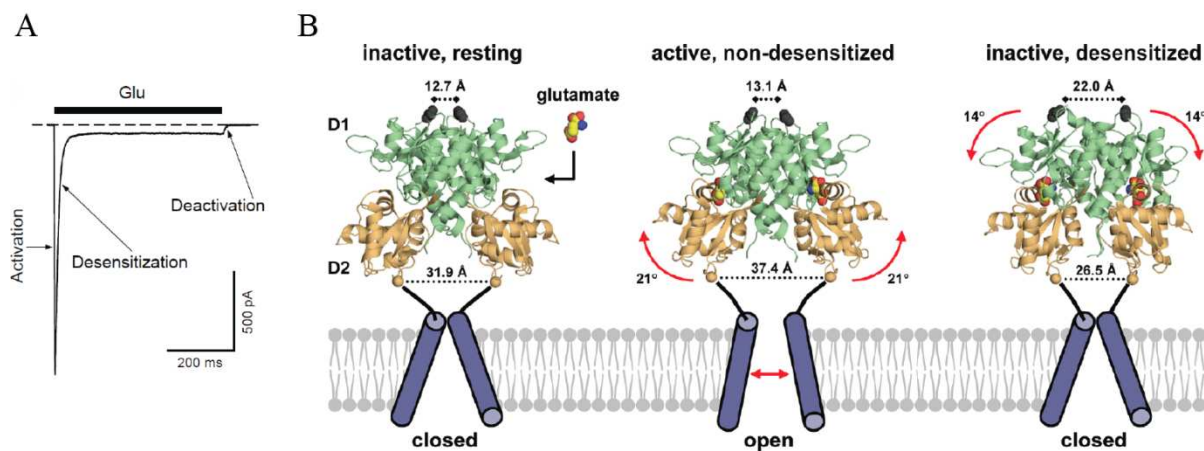


Figure 2.34. Modèle d'activation et de désensibilisation d'un récepteur AMPA. **A.** Courant enregistré en configuration "cellule entière" sur des cellules HEK, exprimant le rAMPA-GluA2, en réponse à une application brève (500 ms) de glutamate 3 mM au potentiel imposé -60 mV (*D'après Sobolevsky, 2013*). **B-**Les trois structures cristallographiques représentent un dimère d'ABDs GluA2 respectivement dans l'état de repos (forme apo, pdb 1FT0), dans l'état activé (lié au glutamate, pdb 1FTJ) et dans l'état désensibilisé (lié au glutamate, pdb 2I3V). La liaison du glutamate dans la crevasse formée par les lobes D1 et D2 induit la fermeture du lobe inférieur sur le ligand. Ce changement conformationnel se traduit par une tension des linkers qui vont s'écarter, induisant une réorganisation des segments transmembranaires et in fine, l'ouverture du canal. La conformation active étant instable, le récepteur peut retrouver une stabilité par deux voies, soit la réouverture des ABDs (et libération du glutamate, c'est la désactivation), soit par un réarrangement de l'interface de dimérisation des ABDs (rupture de l'interface entre les lobes supérieurs et rapprochement des lobes inférieurs) qui mène à la désensibilisation. *D'après Traynelis et al., 2010.*

Les iGluRs s'organisent et fonctionnent au sein du complexe tétramérique en dimère de dimères (Armstrong & Gouaux, 2000 ; Sobolevsky et al., 2009), avec les ABDs de deux

sous-unités adjacentes qui dimérisent *via* une apposition dos-a-dos de leurs lobes supérieurs. La liaison des agonistes dans la crevasse interlobes de chaque ABD en provoque la fermeture, et ce mouvement écarte les lobes inférieurs des deux ABD adjacents. Cette séparation se traduit en tension au niveau des segments transmembranaires (directement reliés aux lobes inférieurs des ABD) : les hélices transmembranaires M3 vont notamment subir des mouvements rotationnels et translationnels, qui aboutissent à l'ouverture du canal ionique. La dimérisation dos-à-dos des ABDs, via leurs lobes supérieurs (Sobolevsky et al., 2009), explique comment la fermeture des ABDs individuels peut entraîner la séparation des lobes inférieurs et *in fine* l'ouverture du canal ionique. En cohérence avec ce modèle (Fig. **2.34.B**), les antagonistes compétitifs des iGluRs (qui sont généralement des molécules assez volumineuses et rigides) se lient au même site que le glutamate, mais ils empêchent la fermeture des ABD (et donc l'ouverture du canal ionique) au lieu de la favoriser (Armstrong & Gouaux, 2000).

En prenant la structure cristallographique du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009) en conformation "canal fermé" comme point de départ, la conformation "canal ouvert" a pu être précisée grâce à des approches de simulation de dynamiques moléculaires sur un récepteur entier, dont l'objectif est de décrire les changements conformationnels subis par le canal ionique durant l'activation (Dong & Zhou, 2011). Malgré leurs limitations, ces approches donnent un premier aperçu des relations structure-fonction dans un iGluR et peuvent ensuite être complétées par des expériences de mutagenèse dirigée puis par les structures d'iGluRs cristallisées dans d'autres états conformationnels. Des études de dynamiques sur des ABDs isolés confirment d'ailleurs elles aussi un mécanisme d'activation en multiples étapes, dont la liaison du ligand, la fermeture de la crevasse interlobes des ABDs, et la formation de liaisons hydrogènes à l'interface entre lobes supérieur et inférieur (Ahmed et al., 2013). L'étendue de l'activation d'un iGluR dépend de la probabilité pour que l'ABD se trouve dans une conformation de fermeture maximale (Ahmed et al., 2011 ; Lau & Roux, 2011). Par ailleurs, ces études mettent en évidence les rôles distincts occupés par les sous-unités proximales et distales (par rapport à l'axe de symétrie des ABDs) dans les mécanismes d'activation des iGluRs, notamment les rAMPAs (Dong & Zhou., 2011) et les rNDMAs (Dai & Zhou, 2013). D'un point de vue fonctionnel, cette asymétrie est à la base de propriétés essentielles des iGluRs (voir Résultats **1.3.4**).

Chez les rAMPA (Jin et al., 2003) et les rKAs (Mayer, 2005 ; Nayeem et al., 2011), il a été montré que les agonistes partiels (ligands capables d'activer le récepteur mais moins efficacement que les agonistes dits totaux, comme le glutamate) provoquaient une fermeture partielle des ABDs. Le degré de fermeture est remarquablement corrélé avec l'efficacité des agonistes partiels à activer l'iGluR (Armstrong et al., 2000 ; Jin et al., 2003). Cependant, l'étendue de la fermeture des domaines ABDs lors de l'activation n'est pas le seul déterminant de l'efficacité d'un agoniste, puisque celle-ci requiert aussi des changements conformationnels des ABDs et plus précisément un mouvement de torsion de quelques degrés (Birdsey-Benson et al., 2010 ; Gill et al., 2008). Par ailleurs, la stabilité de la conformation fermée des ABDs est aussi un élément déterminant de l'activité d'un iGluR. De fait, un seul agoniste partiel peut induire différents états conformationnels des ABDs des rAMPA et rKAs (Poon et al., 2011). Des expériences d'électrophysiologie ont d'ailleurs révélé l'importance de la stabilité de la conformation fermée de l'ABD, favorisée par des interactions entre lobes inférieur et supérieur de l'ABD (Weston et al., 2006), et inversement, défavorisée si on perturbe l'interface entre ces lobes (Weston et al., 2006). Ces résultats sont en adéquation avec l'idée que la liaison des agonistes est un processus en plusieurs étapes, au cours duquel les domaines agonistes se referment plus ou moins sur le ligand, favorisant alors l'apparition de contacts interlobes qui, *in fine*, stabilisent la conformation "ABDs fermés". Concernant les rNMDAs, la liaison d'un agoniste partiel diminue leur probabilité d'ouverture en raison de durées de fermeture plus longues et d'ouverture plus courtes (Kussius & Popescu, 2009 ; Kussiu et al., 2010). Des mesures de LRET (Transfert d'Énergie de Résonance par Luminescence), permettant d'évaluer les changements conformationnels qui interviennent au niveau des ABDs des sous-unités GluN1 et GluN2 dans un rNMDA entier, montrent que la fermeture de l'ABD de GluN1 est similaire, que l'ABD lie un agoniste partiel ou complet, ce qui est en adéquation avec la conformation unique observée dans les structures cristallographiques d'ABDs de GluN1 isolés, en complexe avec des agonistes ou agonistes partiels (Inanobe et al., 2005). En revanche, ces mêmes mesures de LRET ont révélé que, pour les sous-unités GluN2A, le degré de fermeture de l'ABD dépendait de la nature de l'agoniste partiel (Rambhadran et al., 2011), suivant un mécanisme qui ressemblerait donc à celui observé sur les rAMPA.

Si les principes généraux d'activation des iGluRs sont très probablement conservés entre rAMPA, rKAs et rNMDAs (Furukawa et al., 2005 ; Mayer, 2006 ; Paoletti & Neyton,

2007; Traynelis et al. 2010 ; Mayer 2011a et 2011b), chaque famille possède tout de même ses spécificités. Un exemple représentatif est la différence entre les rNMDAs, caractérisés par une conductance unique et une concertation entre les sous-unités lors de l'ouverture du canal ionique (Banke & Traynelis, 2003 ; Kussius & Popescu, 2009), et les rAMPAs et rKAs, qui ont une multitude de conductances unitaires dues à l'activation différentielle des sous-unités individuelles (Rosenmund et al., 1998 ; Jin et al., 2003 ; Poon et al., 2010, 2011 ; Prieto & Wollmuth, 2010). En effet, les rNMDAs nécessitent la liaison simultanée de deux molécules de glycine et deux moléculaires de glutamate pour être activés. Suite à la liaison des quatre agonistes, le canal s'ouvre de manière concertée, ce qui résulte en un niveau de conductance unitaire uniforme (Banke & Traynelis, 2003). Dans le cas des rAMPAs et des rKAs, la fixation du glutamate sur deux des quatre sites possibles suffit à déclencher l'ouverture du canal, l'activation maximale nécessitant l'occupation simultanée des quatre sites (Rosenmund et al., 1998). Les bases structurales à l'origine de ces différences entre rNMDAs et récepteurs non-NMDA sont encore méconnues mais impliquent probablement des interactions entre domaines ABDs et NTDs (Hansen et al., 2013) et des différences dans le couplage entre ABDs et pore *via* les "linkers".

La conformation active d'un iGluR, que nous venons de décrire, n'est cependant pas stable et cette stabilité peut être récupérée par deux voies distinctes : (1) la réouverture des ABDs permettant la dissociation des agonistes et donc la désactivation du récepteur, ou (2) le réarrangement à l'interface de dimérisation (Hansen et al., 2007), qui mènent à la désensibilisation (Fig. 2.34 ; Mayer, 2006).

2.2.8. Mécanismes structuraux de désensibilisation

Lors d'une application prolongée de glutamate, les rAMPAs et rKAs subissent une désensibilisation profonde en une dizaine de millisecondes (Fig 2.35.A ; Furukawa et al., 2005 ; Sun et al., 2002), ce qui est généralement plus lent que la désactivation. Cette

désensibilisation conduit à la fermeture du canal ionique et se traduit par une réduction des courants portés par les iGluRs, en présence continue de glutamate. Elle représente une façon naturelle de supprimer l'activité des iGluRs afin de protéger les neurones d'une entrée excessive de calcium excitotoxique, notamment dans des conditions pathologiques, comme lors d'ischémies cérébrales, durant lesquelles la concentration de glutamate extracellulaire augmente fortement (Lipton, 1999 ; Bordet et al., 2009).

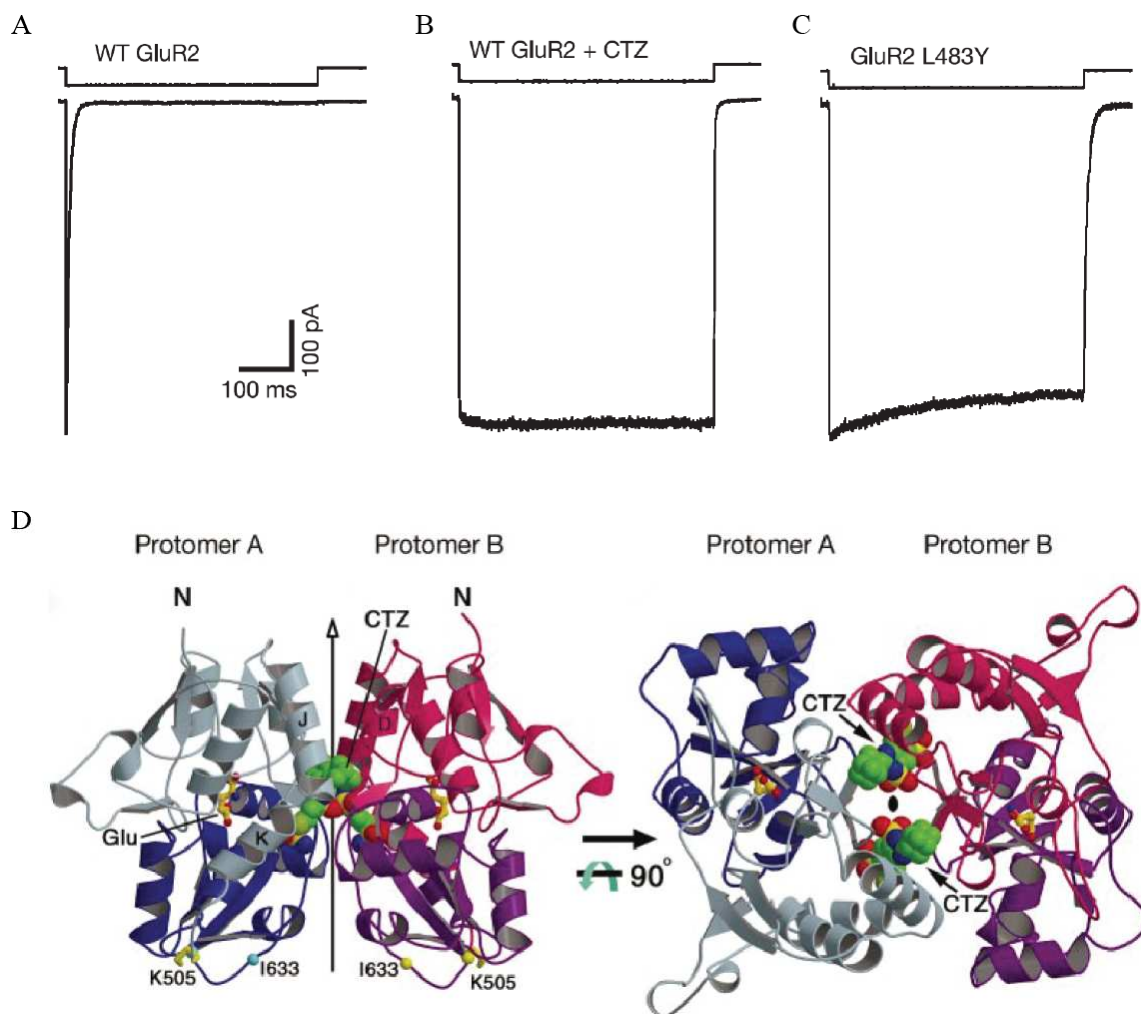


Figure 2.35. Suppression par mutagenèse ou par traitement pharmacologique de la désensibilisation des récepteurs AMPA. A, B, C- Lors d'une application prolongée de glutamate, les rAMPAs (ici, GluR2) désensibilisent profondément sur une échelle de temps de l'ordre de la dizaine de milliseconde (A). Le cyclothiazide CTZ (B) et la mutation GluA2-L483Y (C) bloquent cette désensibilisation rapide et quasi-complète des rAMPAs. D- Structure cristallographique d'un dimère de NTDs GluA2, en présence de glutamate et de CTZ, en vue latérale (*gauche*) et vue de dessus (*droite*) (pdb 1LBC). D'après Sun et al., 2002.

Dans les rAMPA, des modulateurs allostériques, tels que le cyclothiazide (Fig. **2.35. B et D**), l'aniracetam et le CX614, atténuent ou bloquent la désensibilisation (Sun et al., 2002 ; Jin et al., 2005). Des données cristallographiques, établies sur ABD isolés, montrent que le CTZ se lie à l'interface de dimérisation entre deux ABDs adjacents et agit comme une « colle moléculaire » stabilisant cette interface (Fig. **2.35. B et D**). Des expériences d'ultracentrifugation analytique ont d'ailleurs montré que le CTZ diminuait la constante de dissociation du dimère d'ABD de rAMPA-GluA2 d'un facteur proche de 5 000 ($K_d \sim 6$ mM en absence de CTZ et $K_d \sim 1.2$ μ M en présence de CTZ ; Sun et al., 2002). De même, des pontages covalents ou des mutations ponctuelles qui renforcent ou perturbent l'interface de dimérisation entre ABDs, dans les rAMPA (Sun et al., 2002 ; Horning & Mayer, 2004) et les rKAs (Weston et al., 2006 ; Zhang et al., 2006 ; Nayeem et al., 2009 ; Chaudhry et al., 2009b), réduisent ou augmentent respectivement la désensibilisation. Par exemple, la mutation de la leucine 483 de GluA2 en tyrosine (GluA2-L483Y) engendre des rAMPA qui ne désensibilisent quasiment plus (Fig **2.35.C** ; Stern-Bach et al., 1998 ; Sun et al., 2002). La structure cristallographique du dimère d'ABDs de GluA2-L483Y révèle des interactions intermoléculaires renforcées entre deux protomères adjacents. En effet, l'anneau aromatique de la tyrosine introduite est pris en sandwich par la leucine 748, avec qui elle est en interaction hydrophobe, et la lysine 752, deux résidus du protomère adjacent. Le groupement amine de cette lysine contribuerait à la stabilité du dimère d'ABDs, en formant des interactions de type cation- π avec la tyrosine introduite.

De ces résultats, il a été suggéré que la désensibilisation s'accompagnait d'une rupture et du réarrangement de l'interface de dimérisation entre deux ABDs adjacents, qui conduisent à une relaxation de la tension exercée sur les "linkers" entre les lobes inférieurs des ABDs et le pore, et donc à une réversion partielle des mouvements des hélices M3 induits par la liaison du glutamate, ce qui engendre la fermeture du canal. Ce mécanisme permet donc un découplage entre la fermeture des ABDs et l'ouverture du canal ionique, ce dernier pouvant se fermer alors que le glutamate reste lié à chaque ABD individuel.

Le rAMPA-GluA2, pour lequel une cystéine a été introduite à une interface entre les lobes inférieurs des ABDs (mutation GluA2-S729C) est un bon modèle de l'état désensibilisé des iGluRs AMPA et kainate (Armstrong et al., 2006). Dans la structure cristallographique

d'un dimère d'ABDs de cette structure "état désensibilisé", les ABDs individuels, liés au glutamate, conservent leur fermeture maximale, mais les lobes supérieurs se séparent significativement l'un de l'autre. Ainsi, selon ce modèle, la désensibilisation conduit à la rupture de l'interface entre les lobes supérieurs des ABDs, ce qui permet aux lobes inférieurs et aux "linkers" reliant les ABDs au canal ionique d'adopter une conformation semblable à celle au repos. Cette rupture de l'interface entre lobes supérieurs est en accord avec les mesures de FRET sur des rAMPA (Pitt et al., 2010).

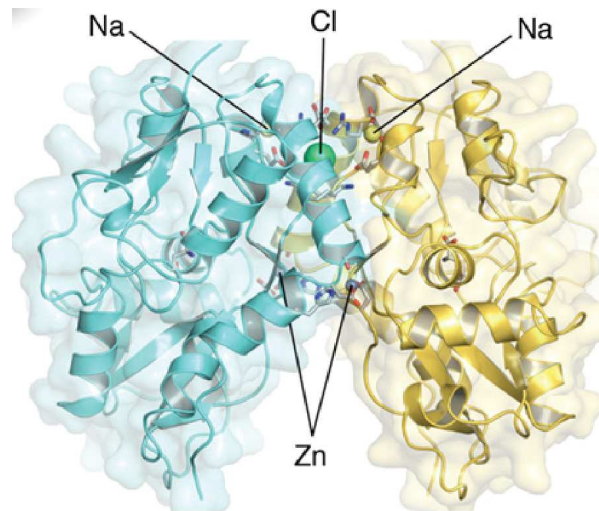


Figure 2.36. Les récepteurs kainate sont modulés par des ions monovalents (Cl^- , Na^+) et divalents (Zn^{2+}). Modèle d'un dimère d'ABDs de rKA-GluK3 établi par homologie avec celui d'un rKA-GluK2 et illustrant la localisation des sites de liaison de deux ions Zn^{2+} , deux ions Na^+ et un ion Cl^- . D'après Veran et al., 2012.

Dans les rKAs, un pontage covalent de l'interface de dimérisation empêche l'accès à l'état ouvert principal, mais autorise des états de conductance plus faible, ce qui suggère que des réarrangements importants de l'interface de dimérisation sont requis pour l'activation (Daniels et al., 2013). Par ailleurs, les structures cristallographiques des dimères d'ABDs de GluK1 et GluK2 mettent en évidence de nouveaux sites de liaison pour des ions mono- et divalents, Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- (Fig. 2.36 ; Hansen et al., 2009 ; Plested & Mayer, 2007 ; Plested et al., 2008 ; Nayeem et al., 2011). Des études ultérieures, notamment des analyses de sédimentation par ultracentrifugation analytique, ont permis d'identifier les mécanismes d'action de Na^+ et Cl^- sur les rKAs. La liaison de ces ions sur ces sites polaires à l'interface de dimérisation des ABDs accroît la stabilité du dimère d'ABDs (Plested & Mayer, 2007 ; Plested et al., 2008 ; Nayeem et al., 2009 ; Veran et al., 2012 ; Dawe et al., 2013), et réduit ainsi la

désensibilisation (Chaudhry et al., 2009a). Par ailleurs, il a été montré que le zinc agissait spécifiquement comme modulateur allostérique positif sur les rKAs homo- ou hétérotétramères contenant la sous-unité GluK3, alors que cet ion inhibe les autres sous-types de récepteurs. Cette potentialisation des courants est principalement due à une réduction de la désensibilisation. D'après la structure cristallographique obtenue, le zinc se fixe à la base de l'interface de dimérisation des ABDs.

Les rNMDAs ne présentent pas de désensibilisation rapide semblable à celle des rAMPA. On observe malgré tout, chez les rNMDAs, une désensibilisation, qui peut prendre différentes formes. Tout d'abord, une désensibilisation dépendante de la glycine est observée en conditions non saturantes de glycine. Elle est due à une interaction allostérique négative entre la liaison du glutamate et celle de la glycine : la liaison de glutamate entraîne une diminution d'affinité pour la glycine, et donc la dissociation de cette dernière en conditions non saturantes (Mayer et al., 1989a). Par ailleurs, une inactivation des rNMDAs peut être induite par l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Legendre et al., 1993), qui, complexé par la calmoduline, se fixerait sur la région C-terminale de GluN1 (Ehlers et al., 1996). Une troisième forme de désensibilisation, qui ne dépend ni de la glycine ni du calcium, est observée quand le contenu intracellulaire est dialysé par le contenu de la pipette de patch-clamp. Cette forme de désensibilisation apparaît donc après des applications prolongées (plusieurs minutes) en configuration "cellule entière" mais beaucoup plus rapidement (quelques dizaines de secondes) en configuration "outside-out". Elle dépendrait de l'état de phosphorylation du récepteur, et résulterait notamment de l'activité de la phosphatase calcineurine (Tong & Jahr, 1994). Enfin, une des particularités des rNMDAs réside dans l'interaction allostérique qui a lieu entre le NTD et l'ABD de la sous-unité GluN2A (Zheng et al., 2001; Erreger & Traynelis, 2005) (voir Résultats **2.3.1**). En effet, la liaison de glutamate sur l'ABD de GluN2A provoque une augmentation de l'affinité du NTD de cette sous-unité pour le zinc. Par conséquent, si du zinc contaminant est présent dans le milieu extracellulaire et à des concentrations non saturantes pour le site zinc de GluN2A, la liaison du glutamate provoque la montée de zinc sur son site. Le zinc étant un inhibiteur allostérique des récepteurs GluN1/GluN2A, cette liaison du zinc provoque une diminution de la réponse des rNMDAs malgré la présence de glutamate. Si les mécanismes structuraux de cette inhibition par le zinc sont dans l'ensemble mal connus, il est clair que les interfaces de dimérisation entre ABDs jouent un rôle central dans cette inhibition. En cela, l'inhibition par le zinc des rNMDAs, via

les NTDs, ressemble au processus de désensibilisation des rAMPAs. Notamment, l'interface de dimérisation des lobes supérieurs des ABDs subit des réarrangements similaires lors de l'inhibition des rNMDAs par le zinc, et lors de la désensibilisation des rAMPAs (Gielen et al., 2008).

En conclusion, un modèle simplifié de l'activation d'un iGluR entier peut être construit en partant des hypothèses suivantes : **(1)** l'état fermé du récepteur est représenté par la structure du rAMPA-GluA2 entier en complexe avec un antagoniste ; **(2)** dans les états désensibilisé et ouvert, l'ABD adopte des conformations similaires à celles observées dans les structures cristallographiques d'ABDs isolés complexés par le glutamate, avec ou sans la mutation GluA2-S729C respectivement ; **(3)** le dimère de dimères de NTDs ne change pas de conformation et reste identique dans les trois états conformationnels représentés ; **(4)** dans l'état désensibilisé, le canal ionique adopte une conformation identique à celle de l'état fermé, mais adopte une conformation de type « canal potassique Shaker » dans l'état activé. D'après ce modèle, l'iGluR entier subit un mouvement de torsion et un raccourcissement durant l'activation, et reprend sa conformation initiale (non "twistée" et élongée) lors de la désensibilisation (Sobolevsky et al., 2013 ; Suzuki et al., 2013). En particulier, Y.Suzuki et ses collègues ont décrit, par AFM et en utilisant des molécules de glutamate cagées, une réduction rapide de la "hauteur" d'un rNMDA individuel de 7.3 nm à 3.5 nm, lors de l'activation.

Même si ce modèle est sans doute une version simplifiée de ce qui se passe en réalité lors du "gating" d'un iGluR, il peut servir de base pour des expériences futures visant à mieux comprendre les mécanismes d'activation et de désensibilisation des iGluRs. Notamment, des modélisations moléculaires seront nécessaires afin de développer le modèle d'un point de vue énergétique. D'ailleurs, certaines études ont déjà apporté des prédictions intéressantes, notamment un mouvement vertical des TMDs lors de l'activation des rAMPAs (Dong & Zhou, 2011) et une contribution au « gating » plus importante pour les sous-unités externes (paire B/D) qu'internes (paire A/C) (Dong & Zhou, 2011 ; Dai & Zhou, 2013, voir aussi Résultats **1.3.4**). Tous ces modèles prédisant les dynamiques conformationnelles des iGluRs peuvent être éprouvés expérimentalement par des approches structurales et fonctionnelles incluant l'électrophysiologie, la cristallographie, la RMN, la mutagenèse dirigée et les analyses de FRET.

3. BIOGENESE ET ARRANGEMENT DES RECEPTEURS-CANAUUX DU GLUTAMATE

La biosynthèse des protéines membranaires se déroule dans le réticulum endoplasmique (RE), un organite présent dans les cellules eucaryotes et lié à la membrane nucléaire (Ellgaard & Helenius, 2003) (Fig. 3.1). Au fur et à mesure de leur synthèse par le ribosome, les domaines transmembranaires des protéines sont intégrés à la membrane du RE, et plus précisément, au cœur apolaire de sa bicouche lipidique, via un complexe protéique transporteur nommé translocon. Ce dernier est constitué de plusieurs protéines arrangées autour d'un pore transmembranaire central permettant le passage de la chaîne polypeptidique en cours de biosynthèse, du ribosome vers la lumière du RE. Simultanément, la protéine naissante fait l'objet de modifications (pontages disulfures, *N*-glycosylation...) ce qui aboutit finalement à l'assemblage du polypeptide au sein d'un complexe monomérique ou multimérique fonctionnel. Ce processus d'assemblage est assisté par des protéines chaperonnes, notamment les membres des familles Hsp 70, Hsp 40 et Hsp 90 (Bannyckh et al., 1996). Quand des protéines mal ou non assemblées s'accumulent dans le RE, des signaux UPR (unfolded protein response) sont déclenchés. Ils ciblent notamment ces protéines chaperonnes en les sur-régulant, et des protéines kinases du RE afin d'atténuer la transcription, et donc faire diminuer les stocks de protéines non assemblées. Les protéines mal repliées, mal assemblées ou dénaturées sont exportées hors de la lumière du RE par rétrotranslocation, ubiquitinées (liaison covalente entre un résidu glycine de la protéine et plusieurs ubiquitines) puis dégradées en peptides par le protéasome, un complexe enzymatique multiprotéique (Bertolotti et al., 2000 ; Harding et al., 2001). Dans le cas des récepteurs AMPA (rAMPAs), il a été montré que la stargazine et la protéine chaperonne BiP étaient co-localisées dans le RE, ce qui suggère que la stargazine assiste l'assemblage du rAMPA lors de conditions de stress (sans être toutefois indispensable ; Vandenberghe et al., 2005). Lorsqu'elles sont assemblées, les protéines quittent le RE vers l'appareil de Golgi puis migrent vers la surface de la cellule, *via* des vésicules de transfert. Une fois à la membrane plasmique, les protéines diffusent latéralement (Choquet & Triller, 2005) et interagissent avec une variété de protéines d'échafaudage qui, dans le cas des récepteurs-canaux de la neurotransmission, facilitent leur localisation et ancrage à la synapse (Nakagawa et al., 2004 ; Sheng & Kim, 2011)

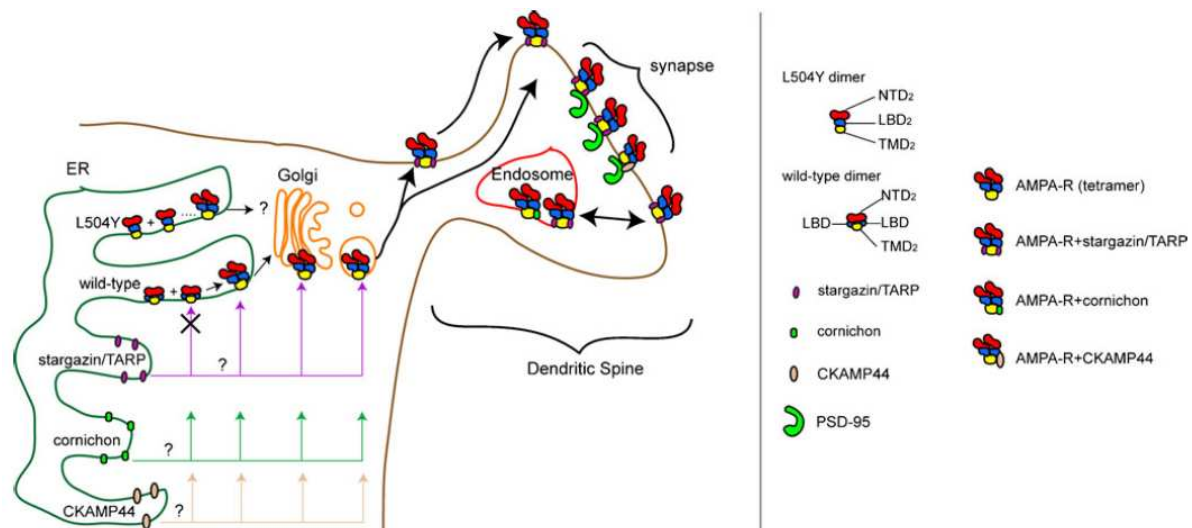


Figure 3.1. Les récepteurs membranaires synthétisés et assemblés dans le réticulum endoplasmique migrent ensuite vers la membrane plasmique *via* l'appareil de Golgi. Cas des récepteurs AMPA. *D'après Nakagawa, 2010*

3.1. Assemblage des récepteurs-canaux

Les récepteurs-canaux forment des multimères associant plusieurs sous-unités, distinctes ou non. Ainsi, si certains peuvent former des homomères, pour d'autres, l'assemblage hétéromérique est un prérequis à leur fonctionnement et leur transfert jusqu'à la membrane plasmique. C'est notamment le cas des récepteurs nicotiques à acétylcholine (nAChRs) musculaires (Wanamaker et al., 2003) et des récepteurs NMDA (rNDMA ; Cull-Candy et al., 2001). Les gènes encodant ces sous-unités sont le plus souvent présents sur des chromosomes différents. D'autres peuvent, sous certaines conditions, former des complexes homomériques, même si, *in vivo*, on les retrouve majoritairement sous forme hétéromérique. C'est le cas de certains membres de la famille des récepteurs-canaux pentamériques (les récepteurs GABA_A (Tsetlin et al., 2011) et les nAChRs du SNC (Wanamaker et al., 2003)) et des récepteurs-canaux du glutamate (iGluRs) de type AMPA et kainate (Lu et al., 2009). Les mécanismes impliqués dans les préférences d'assemblage sont les suivants : la disponibilité du partenaire d'hétéromérisation, qui dépend du niveau d'expression d'une sous-unité donnée dans une

cellule donnée, les cinétiques de traduction et de translocation à travers la membrane du RE, le taux de protéines assemblées dans le RE, l'affinité entre sous-unités et leur diffusion latérale dans la membrane du RE.

L'assemblage des récepteurs-canaux pentamériques a été étudié dès le début des années 90, avec des travaux sur le nAChR de *Torpedo* (Green et al., 1993) puis sur le nAChR de cellules musculaires de souris (Kreienkamp et al., 1995). Cette dernière étude a montré qu'un nAChR était formé par l'association entre un dimère de sous-unités α et δ et un trimère β - α - γ pour aboutir, *in fine* au pentamère α - γ - α - δ - β . Des expériences sur des chimères ont permis d'identifier les régions des sous-unités impliquées dans l'assemblage et la diffusion des récepteurs vers la membrane plasmique. En particulier, il a été montré que les domaines extracellulaires jouaient un rôle majeur dans l'assemblage des récepteurs-canaux pentamériques nAChRs. Le domaine intracellulaire est également impliqué, surtout dans la dernière étape, *via* la boucle cytoplasmique de la sous-unité α . Enfin, récemment, il a été montré qu'un réseau aromatique d'interactions entre les trois segments transmembranaires M1, M3 et M4, était un élément essentiel de l'assemblage des récepteurs glycinergiques, une sous-famille de récepteurs pentamériques (Haeger et al., 2010).

Concernant les récepteurs GABA_A, certaines combinaisons de sous-unités (α_1 , β_2 , et γ_2 d'une part ; α_1 et β_2 d'autre part) produisent des récepteurs effectivement exprimés à la membrane plasmique. A contrario, les combinaisons $\alpha_1\gamma_2$ et $\beta_2\gamma_2$ sont retenues dans le RE (Connolly et al., 1996). De nouveau, des résidus des domaines N-terminaux des sous-unités GABA_A (notamment de β_3 et de α_1) ont été désignés comme essentiels à l'assemblage du récepteur (Klausberger et al., 2001).

En ce qui concerne les récepteurs-canaux trimériques P2X, les sept sous-unités peuvent former des homomères, à l'exception de la sous-unité P2X6 qui doit obligatoirement s'associer avec l'une des deux sous-unités P2X2 ou P2X4 pour former des récepteurs fonctionnels (Barrera & Edwardson, 2008). Dans le cas contraire, la sous-unité P2X6 est retenue dans le RE. La stœchiométrie des récepteurs contenant P2X6 dépend de l'expression relative des sous-unités dans une région donnée (Barrera et al., 2007). Les sous-unités P2X2

et P2X1, lorsqu'elles sont co-exprimées forment préférentiellement des hétéromères, plutôt que des homomères (Aschrafi et al., 2004). Il est probable que l'assemblage de trois sous-unités commence par la dimérisation de P2X1 et P2X2 puis un des deux monomères vient compléter l'assemblage. L'étude de récepteurs mutants privés de certaines régions a par ailleurs montré que ni l'extrémité C-terminale, ni l'extrémité N-terminale n'était importante pour l'assemblage du récepteur ou sa sortie du RE (Torres et al., 1998). En revanche le segment transmembranaire TM2 est crucial pour l'assemblage du récepteur (Torres et al., 1999).

Contrairement aux récepteurs-canaux pentamériques et aux récepteurs P2X, les interfaces entre les sous-unités d'iGluRs ne sont pas toutes analogues. Comme nous l'avons vu précédemment (Introduction 2.2.6), les iGluRs tétramériques fonctionnent en fait en dimères de dimères. Or l'arrangement de ces deux dimères dans le complexe entier, que ce soit au niveau des domaines extracellulaires ou des domaines transmembranaires, est encore mal compris. En raison du niveau de complexité de cette organisation, il est très difficile de définir précisément les étapes d'oligomérisation des iGluRs.

3.2. L'assemblage et l'arrangement des sous-unités au sein d'un récepteur AMPA tétramérique se fait en plusieurs étapes.

La synthèse d'une sous-unité d'iGluR commence par le NTD, domaine qui suit immédiatement le peptide signal dans la structure primaire de la protéine. Puis sont synthétisés le segment S1 de l'ABD et les segments transmembranaires M1, M2 et M3. Après intégration de cette portion M1-M3 de la protéine dans la bicouche lipidique du RE, la synthèse continue avec le segment S2 de l'ABD, puis le segment transmembranaire M4 et enfin l'extrémité C-terminale cytoplasmique. L'assemblage de ces sous-unités individuelles néo-synthétisées au sein d'un complexe tétramérique se déroule en deux étapes : (1) l'interaction de deux sous-unités pour former un dimère, considéré comme un intermédiaire

essentiel de biogenèse, puis (2) l'assemblage de deux dimères distincts pour former un tétramère complet (Ayalon et al., 2001). Précisons que l'oligomérisation n'est possible qu'entre sous-unités d'une même famille (AMPA, kainate ou NMDA), grâce aux NTDs qui jouent le rôle de "domaines de compatibilité" et de reconnaissance entre sous-unités iGluRs (Leuschner & Hoch, 1999; Ayalon & Stern-Bach, 2001; Ayalon et al., 2005).

Dimérisation des NTDs

Le NTD étant le premier domaine traduit, il constitue un élément central de l'assemblage des iGluRs. Divers travaux ont montré que les NTDs des rAMPAs dimérisaient facilement en solution (Kuusinen et al., 1999) et constituaient donc le point de départ de la formation de dimères à partir de monomères (Clayton et al., 2009 ; Jin et al., 2009 ; Ayalon et al., 2005). Une étude récente, basée sur l'induction par l'effecteur DOX de l'expression de GluA2 dans des cellules HEK, a d'ailleurs mis en évidence la chronologie des événements aboutissant à la formation d'un récepteur fonctionnel (Shanks et al., 2010). Douze heures après l'induction, la majorité des sous-unités ont dimérisé, puis durant les douze heures suivantes, les rAMPAs s'assemblent en complexes tétramériques et sont transférés de l'appareil de Golgi à la membrane de la cellule. Ainsi, l'expression du rAMPA à la membrane plasmique a atteint son maximum une journée après l'induction.

Cette facilité avec laquelle les NTDs dimérisent s'explique de différentes façons. Tout d'abord, les interactions entre deux sous-unités identiques sont favorisées par la forte concentration locale d'une sous-unité donnée dans la membrane du RE juste après leur synthèse. Par ailleurs, la diffusion dans la bicouche lipidique des protéines néo-synthétisées est limitée, d'autant plus qu'elles interagissent avec un réseau de protéines chaperonnes présentes dans la lumière du RE : les collisions entre protéines éloignées sont donc restreintes (Greger & Esteban, 2007). Enfin, il a été démontré que les NTDs isolés des rAMPAs et, dans une moindre mesure, ceux des rKAs, formaient des homodimères de haute affinité (Fig. 3.2 ; Rossmann et al., 2011), stabilisés par de nombreux contacts impliquant les deux lobes des

NTDs (Sobolevsky et al., 2009 ; Kumar et al., 2011). L'interface entre les lobes inférieurs des NTDs est généralement plus lâche que celle entre les lobes supérieurs et surtout beaucoup moins conservée d'une sous-unité rAMPA à l'autre. Cela explique probablement les diverses affinités d'homodimérisation des NTDs observées selon la sous-unité (Rossmann et al., 2011 ; Greger et al., 2007).

Tétramérisation des sous-unités

Dans une seconde phase, les dimères s'associent pour former des tétramères, avec l'apparition de nouvelles interfaces entre dimères de NTDs et un réarrangement des interfaces existantes. Lors de la tétramérisation le canal ionique se forme et les ABDs s'associent sous-forme de dimère de dimères (Fig 3.3 ; Sobolevsky et al., 2009).

Récemment, Rossmann et al. (2011) ont développé des essais d'ultracentrifugation (AU-FDS) très sensibles sur des domaines isolés, qui permettent de détecter les interactions entre NTDs notamment, à la fois pour les combinaisons homo- et hétéromères. Cette approche a mis en évidence la préférence des sous-unités de rAMPAs à former des hétéromères, plutôt que des homomères. Ces préférences d'assemblage sont en grande partie guidées par les différentes affinités d'association des NTDs entre eux. Les auteurs ont ainsi mis en évidence une large gamme d'affinités couvrant quatre ordres de grandeur selon la nature des NTDs (Fig. 3.2). Alors que l'assemblage des NTDs des sous-unités GluA2 est très favorisé (K_d inférieur à 2 nM), les sous-unités GluA3 dimérisent, elles, très difficilement (K_d supérieur à 1 mM). Les dimères de NTDs de GluA1, enfin, se caractérisent par un K_d intermédiaire, de l'ordre de 30 à 100 nM. Ces affinités, NTD-spécifiques, et les concentrations relatives en sous-unités, qui diffèrent selon la population neuronale, sont des déterminants majeurs du processus d'assemblage tétramérique des rAMPAs (Rossmann et al., 2011).

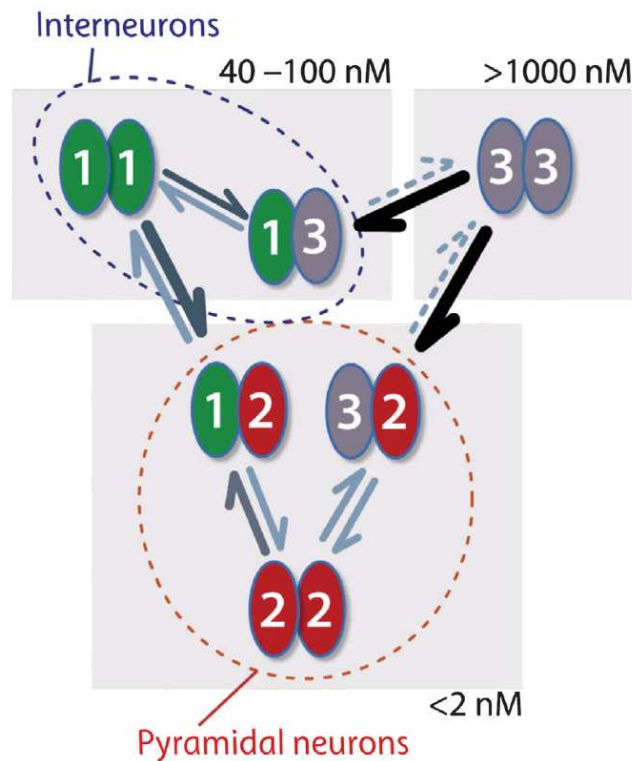


Figure 3.2. Les différentes affinités d'association entre NTDs de récepteurs AMPA dictent en grande partie les spécificités d'assemblage et de composition en sous-unités. Très élevé, le K_d d'association des NTDs de GluA3 défavorise fortement leur dimérisation. A contrario, les sous-unités GluA2, très présentes dans les neurones pyramidaux, dimérisent très facilement ($K_d < 2$ nM) et les sous-unités GluN1, majoritaires dans les interneurons, forment des assemblages d'affinité intermédiaire. *D'après Rossman et al., 2011).*

Les interactions entre domaines ABDs en solution, sont quant à elles si faibles, qu'elles ne peuvent être mesurées par l'AUC (concentrations maximales mesurables de l'ordre de la dizaine de millimolaires) (Weston et al., 2006 ; Sun et al., 2002). En revanche, la relative proximité des ABDs dans le tétramère en cours d'assemblage leur permet d'interagir. Des analyses de rAMPAs-GluA2, purifiés en cours de biosynthèse, par microscopie électronique en cellules HEK, a ainsi montré que les ABDs avaient un rôle important dans le passage du dimère GluA2 au récepteur tétramérique final (Shanks et al., 2010). La séparation (i.e. la non association) des ABDs dans le dimère initial est même un pré-requis à l'assemblage final du tétramère (Fig. 3.3, gauche). En effet, le mutant GluA2-L504Y, qui empêche la désensibilisation du rAMPA-GluA2 en stabilisant l'interface de dimérisation entre les lobes supérieurs de deux ABDs adjacent (Sun et al., 2002), est très peu exprimé à la

surface des cellules. Ce défaut d'expression vient en fait d'un problème d'assemblage du rAMPA muté dont les sous-unités, stabilisées dans le dimère par des interactions entre ABDs, ne peuvent s'assembler ensuite dans un tétramère (Fig. 3.2, droite). Ces observations supportent donc le modèle selon lequel le passage du dimère au tétramère est assuré par l'apparition de nouvelles interactions entre des ABDs de deux dimères distincts (Fig 3.3 : dimère d'ABDs bleu-violet). En conclusion, dans le rAMPA tétramérique final, le NTD et l'ABD de chaque sous-unité forment des dimères avec une sous-unité voisine différente. Cette organisation est d'ailleurs en complet accord avec l'arrangement observé dans la structure cristallographique du rAMPA-GluA2, caractérisée par la permutation de sous-unités ("domain swapping") (Sobolevsky et al., 2009), phénomène faisant référence à l'échange des sous-unités voisines formant les dimères constitutifs du récepteur, entre la couche des ABDs et celle des NTDs (voir Introduction 2.2.6.2 et Fig.2.30 et 2.32) .

Enfin, le domaine transmembranaire (TMD) des rAMPAs est également impliqué dans la dimérisation initiale entre sous-unités mais surtout dans l'oligomérisation ultérieure (Fig. 3.3 ; Ayalon et al., 2001). Le segment M2 semble jouer un rôle important dans l'assemblage. Il possède une glutamine (Q607) qui est éditée en arginine (R) dans la plupart des sous-unités GluA2 du SNC, alors que les sous-unités GluA1, GluA3, GluA4 ne subissent pas cette édition (Seeburg, 1996). L'effet de l'édition Q/R sur l'assemblage interviendrait lors de la transition entre l'intermédiaire dimérique et le complexe hétérotétramérique final. En effet, le rapprochement des quatre TMDs des sous-unités GluA2 éditées, chacune comprenant une charge positive à la position 607, est peu probable en raison d'une trop grande répulsion électronique entre résidus arginines, en revanche cette situation est en faveur de l'interaction avec une autre sous-unité non éditée et donc de la formation d'hétéromères (Greger et al., 2003). Un autre élément essentiel à la stabilisation du complexe tétramérique, et qui n'était pas attendu avant l'obtention de la structure cristallographique du rAMPA-GluA2, est l'interaction du segment M4 avec les hélices M1 et M3 de la sous-unité adjacente (Sobolevsky et al., 2009). Cette interaction joue probablement un rôle important lors de l'assemblage du récepteur tétramérique. Elle est également essentielle à l'expression des rAMPAs à la surface de la cellule (Salussolia et al., 2011). Dans ce dernier article, les auteurs ont montré que l'absence du segment transmembranaire M4 empêchait l'expression membranaire de la sous-unité GluA1, et que cet effet n'était pas dû à l'impossibilité pour le TMD d'établir des contacts avec l'ABD mais plutôt à l'absence d'interaction entre des résidus de M4 formant une face

"interne" de l'hélice et des résidus des hélices transmembranaires M1 et M3 de la sous-unité adjacente.

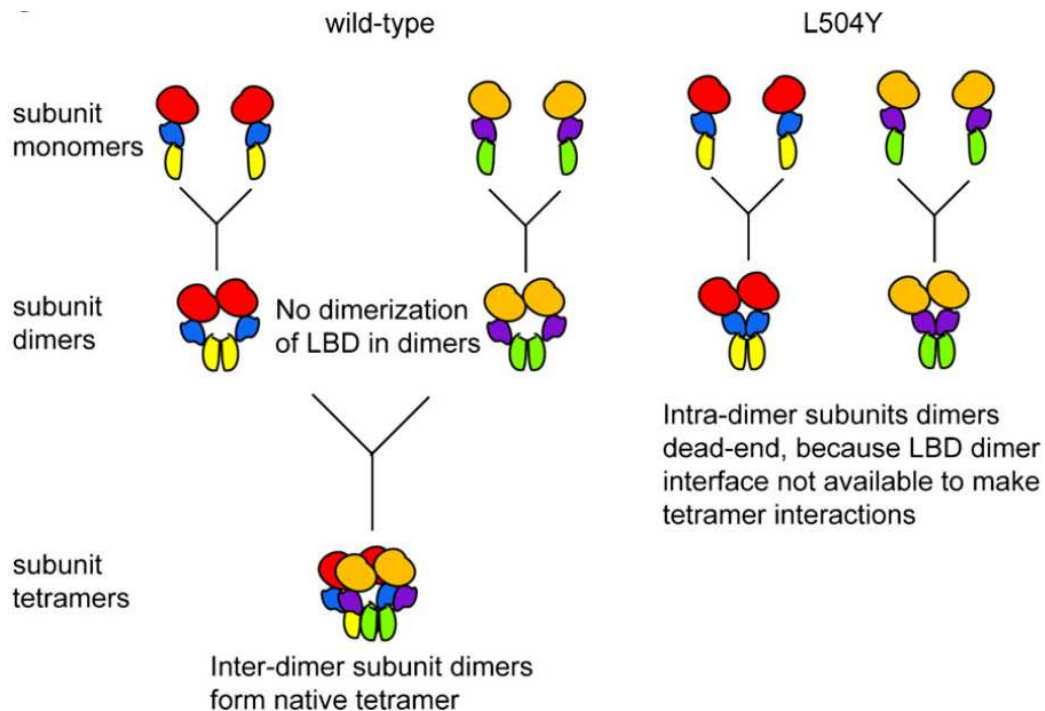


Figure 3.3. Mécanisme proposé pour l'assemblage des récepteurs AMPA. L'initiation de l'assemblage d'un rAMPA homotétramérique est assurée par la dimérisation des NTDs. Dans le dimère formé (de type sauvage), les ABDs ne dimérisent pas. Selon les auteurs le dimère d'ABDs n'est formé que durant le passage du dimère au tétramère. En revanche, les ABDs des sous-unités mutées GluA2-L504Y dimérisent au sein du dimère rAMPA, ce qui empêche le récepteur de s'assembler correctement : la tétramérisation n'est pas possible. Les NTDs sont représentés en rouge et orange, les ABDs en bleu et violet et les TMDs en jaune et vert. *A partir de Nakagawa, 2010*

Cet assemblage des rAMPAs en deux étapes, avec (1) la formation d'un dimère stabilisé par des interactions entre NTDs, puis (2) la rencontre entre deux de ces dimères et la dimérisation des ABDs qui en résulte, pour former un tétramère complet, permet de décrire la formation de rAMPAs homomériques (Fig. 3.3). Or, *in vivo*, on trouve principalement des rAMPAs hétérotétramériques, associant le plus souvent une sous-unité GluA2 à l'une des sous-unités GluA1 ou GluA3 (Traynelis et al., 2010). Pour ces récepteurs, la question de

l'assemblage est plus complexe : on ignore encore comment, et dans quel ordre, deux sous-unités d'un type et deux sous-unités de l'autre s'assemblent, pour former un complexe hétérotétramérique. Il est vraisemblable qu'initialement, les sous-unités dont les NTDs dimérisent facilement (notamment GluA2 et, dans une moindre mesure, GluA1) forment des homodimères, car juste après la synthèse des monomères dans le RE, la concentration localement élevée en sous-unités favorise les rencontres entre NTDs. A partir de ce postulat, deux hypothèses sont envisageables concernant la formation du tétramère (Fig. 3.4). Il peut avoir pour origine l'association de deux homodimères formés par dimérisation des NTDs, comme on peut l'observer dans le cas des rAMPA homomériques, à ceci-près que dans le cas de récepteurs hétéromériques, les deux dimères sont chimiquement distincts. L'assemblage s'achève alors avec la tétramérisation des TMDs, l'hétérodimérisation des ABDs (association entre ABDs des deux dimères distincts), et éventuellement un réarrangement des interfaces entre NTDs (Herguedas et al., 2013). Le tétramère peut aussi se former à partir de deux monomères (dont les NTDs homodimérisent très difficilement) qui viennent s'immiscer dans la structure d'un homodimère initialement formé. Cette "intrusion" conduit à un réarrangement des interfaces existantes dans l'homodimère initial et l'apparition de nouvelles interfaces hétéromériques. Le récepteur final s'arrange finalement en dimère d'hétérodimères, dans la couche des ABDs et celle des NTDs. Concernant les rKAs hétéromériques, associant le plus souvent GluK4 ou GluK5 à l'une des sous-unités GluK1, GluK2 ou GluK3 (un hétérodimère de NTDs GluK2/GluK5, de haute affinité, a été cristallisé ; Kumar et al., 2011), le même problème se pose, avec les deux hypothèses qui sont également envisageables.

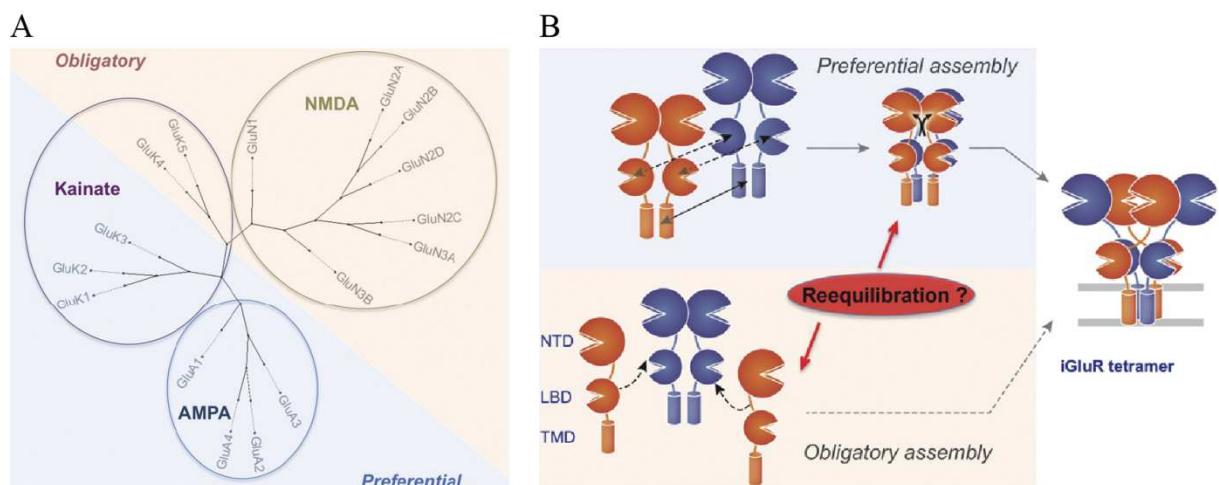


Figure 3.4. Les récepteurs-canaux du glutamate peuvent être répartis en deux catégories selon leur mode d'association. **A-** Les rAMPA et les rKAs composés des sous-unités GluK1-3 s'assemblent "préférentiellement" en hétéro-tétramères, mais ces sous-unités peuvent aussi se rencontrer sous forme d'homomères. Les sous-unités de rNMDAs et GluK4, GluK5 ne peuvent pas former d'homomères fonctionnels, ils forment donc "obligatoirement" des hétérotétramères. **B-** Les récepteurs qui s'assemblent "préférentiellement" en hétéromères forment initialement des homodimères *via* des contacts entre NTDs. Deux de ces dimères s'assemblent ensuite pour former un tétramère, *via* une trans-dimérisation des ABDs et une tétramérisation des TMDs (*en haut*). Les récepteurs qui forment "obligatoirement" des hétéromères viennent "s'incruster" dans un homodimère déjà formé pour former un hétérotétramère (*en bas*).

3.3. Cas particulier des récepteurs NMDA hétérotétramériques

Les rNMDAs sont des récepteurs "obligatoirement" hétéromériques, associant le plus souvent deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2. La question posée pour les rAMPA et les rKAs hétéromériques concernant l'assemblage des sous-unités est donc valable pour les rNMDAs. Néanmoins, on dispose pour les rNMDAs de données solides permettant d'éclaircir ce problème d'assemblage entre deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2.

Tout d'abord, il est bien établi que les sous-unités GluN1 peuvent s'associer, en système recombinant ou dans des systèmes natifs, pour former des homo-oligomères intracellulaires stables, alors que les sous-unités GluN2 n'en sont pas capables (McIlhinney et al., 1998 ; Okabe et al., 1999 ; Horak & Wenthold, 2009 ; Farina et al., 2011). En raison de leur localisation intracellulaire et de leur stabilité, ces homodimères GluN1 forment très probablement la "matrice" de base à partir de laquelle les rNMDAs hétérotétramériques s'assemblent. Des études passées ont d'ailleurs suggéré que la sous-unité GluN1 était impliquée dans l'initiation de l'assemblage (Atlason et al., 2007). Plus récemment, A.N. Farina, T.Nakagawa et leurs collègues, ont démontré, par une approche combinant cristallographie, microscopie électronique de particules uniques et biochimie, que les NTDs des sous-unités GluN1 pouvaient former des complexes dimériques dans le cytoplasme (Farina et al., 2011) et jouer, comme dans le cas des rAMPA et des rKAs, un rôle essentiel

dans l'assemblage des rNMDAs. Ainsi, aucune expression surfacique ne peut être détectée lorsque la sous-unité GluN2A de type sauvage est co-exprimée avec la sous-unité GluN1 privée de son NTD (Farina et al., 2011 ; voir également Meddows et al., 2001). Enfin, des mesures d'affinité à l'équilibre sur domaines isolés indiquent que l'hétérodimérisation de NTDs de GluN1 et GluN2 est fortement favorisée (K_d proche de 1 μ M) par rapport à l'homodimérisation des NTDs, que ce soit de GluN2 ou même de GluN1 (Karakas et al., 2011).

De ces résultats, on peut déduire que les NTDs jouent un rôle essentiel dans l'assemblage des rNMDAs, non seulement dans l'étape initiale de dimérisation entre deux sous-unités GluN1, mais aussi lors de l'hétérotétramérisation finale, qui implique probablement un réarrangement des interfaces entre NTDs. Ces informations ont été confirmées par l'ensemble du travail de Farina et de ses collègues, qui sont parvenus à cristalliser un homodimère de NTDs de GluN1. L'arrangement des NTDs au sein de cet homodimère diverge fortement de celui décrit pour les rAMPAs et rKAs ce qui suggère que la structure et les mécanismes impliquant les NTDs des rNMDAs sont différents de ceux qui caractérisent les rAMPAs et rKAs (voir Introduction **2.2.6.1**). Selon les auteurs, l'homodimérisation de GluN1 est le point de départ de la biosynthèse du récepteur. Cette première étape est indispensable à un assemblage correct des sous-unités car l'homodimère de NTDs GluN1 assiste le recrutement ultérieur des sous-unités GluN2 grâce à une géométrie favorable à l'hétérodimérisation (Fig. **3.5**). Lors de cette ultime étape, la rupture de l'interface entre NTDs de GluN1 promeut leur interaction avec les NTDs des sous-unités GluN2, ce qui stabilise finalement le rNMDA hétérotétramérique. C.H. Lee et E. Gouaux ont d'ailleurs publié, au même moment, que les NTDs du rNMDA s'associaient en dimères d'hétérodimères par l'intermédiaire d'interactions entre les lobes supérieurs des NTDs de GluN1 et GluN2 (Lee & Gouaux, 2011 ; Mony et al., 2011)

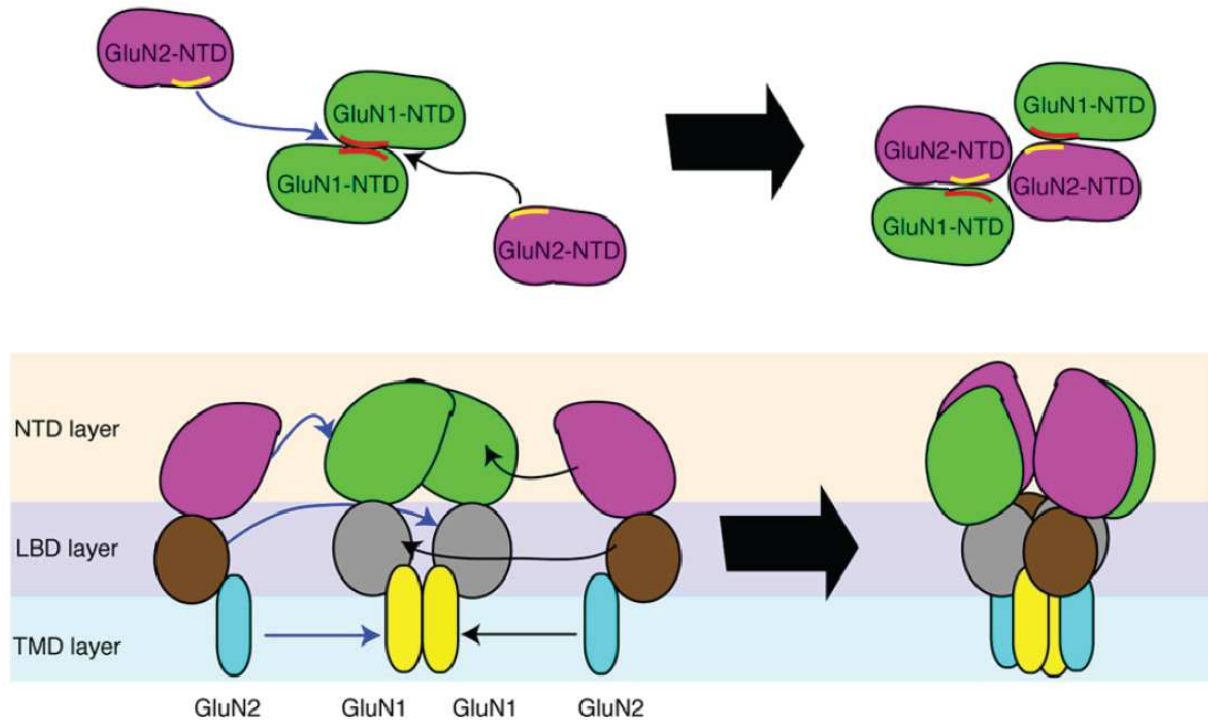


Figure 3.5. Modèle d'assemblage des récepteurs NMDA hétérotétramériques GluN1/GluN2. Les auteurs proposent le modèle ci-dessus pour décrire le réarrangement des NTDs au cours de l'assemblage des rNMDAs hétérotétramériques. Les sous-unités GluN2 (NTDs roses) restent monomériques tandis que les sous-unités GluN1 (NTDs verts) dimérisent via leur NTD. L'homodimérisation initiale des NTDs de GluN1 puis la dissociation de cet intermédiaire de biosynthèse, sont essentiels à l'hétérotétramérisation des rNMDAs. Lors de cette ultime étape, le recrutement des monomères GluN2 s'accompagne de la création de nouvelles interfaces de dimérisation et de tétramérisation, entre les NTDs d'une part et entre les ABDs d'autre part. En particulier, les ABDs forment un dimère d'hétérodimères, en accord avec la structure cristallographique du dimère d'ABDs GluN1/GluN2A (pdb 2A5T, Furukawa et al., 2005). Concernant les TMDs, par analogie avec les rAMPA (Shanks et al., 2010), il est proposé que les TMDs de GluN1 dimérisent dès le début de l'assemblage. La ligne rouge représente l'interface de dimérisation des NTDs de GluN1, la ligne jaune indique la région du NTD de GluN2 qui participe aux contacts avec le NTD de GluN1. *D'après Farina et al., 2011.*

4 UNE NOUVELLE APPROCHE : UTILISATION D'ACIDES-AMINÉS NON-NATURELS POUR L'ÉTUDE DES RÉCEPTEURS-CANAU

4.1. L'incorporation d'acides aminés non-naturels génétiquement encodés : une technologie innovante basée sur l'expansion du code génétique

Avec la naissance et le développement de la protéomique, les chercheurs ont dû mettre en place un grand nombre de stratégies afin de mieux comprendre les fonctions de chaque protéine du génome (Auerbach et al., 2002). De nos jours, la résonance magnétique nucléaire (RMN), la cristallographie, la spectrométrie de masse, l'électrophysiologie, la fluorométrie à potentiel imposé (VCF) et la modélisation moléculaire, sont autant d'approches permettant d'étudier les protéines d'un point de vue structural et fonctionnel (Hancock et al., 2002 ; Wyss et al., 2012).

Dans ce chapitre, je présenterai une nouvelle technique d'ingénierie des protéines que l'on nomme "mutagenèse par acides-aminés non-naturels". Cette technique est une extension puissante de la mutagenèse dirigée des protéines, qui permet d'incorporer à un site spécifique d'une protéine, un acide-aminé artificiel (i.e. non-naturel). Les acides-aminés non-naturels (UAAs) sont porteurs de fonctions physico-chimiques absentes dans les vingt acides-aminés canoniques, et constituent donc une opportunité de générer des protéines avec des propriétés fonctionnelles nouvelles ou renforcées. Je présenterai ici un bref rappel historique de la méthode, ses principes et ses applications notamment pour l'étude des récepteurs-canaux, de leurs structures et de leurs fonctions.

4.1.1 Rappel historique sur la méthodologie des acides-aminés non-naturels

Contrairement aux méthodes de mutagenèse classique couramment utilisées en biologie moléculaire, la mutagenèse dirigée utilisant des acides-aminés non-naturels (ou UAAs ou Unnatural Amino-Acids) est encore au stade de développement. Deux groupes indépendants ont été pionniers dans ce domaine, l'un mené par A.R. Chamberlin et son collaborateur S. Benner (Bain et al., 1992) et l'autre dirigé par P.G. Schultz (Noren et al., 1989). La stratégie qu'ils ont développée, vers la fin des années 80, est basée sur l'utilisation d'ARNt-suppresseurs de codons non-sens (ie ARNt dont l'anticodon a été muté afin de devenir complémentaire d'un codon-stop), chimiquement aminoacylés et capables de traduire en acide-aminé non-naturel le codon-stop ambre, l'un des trois codons-stop marquant la fin de la traduction d'une protéine (concept de lecture ou "read-through" d'un codon stop ; Fig. 4.1). Concrètement, cette technique permet d'introduire un UAA dans un gène d'intérêt et à un site particulier : durant la traduction, lorsque le ribosome parcourt l'ARN et qu'il s'arrête sur le codon-stop UAG, il va, par l'intermédiaire de l'ARNt-suppresseur, incorporer l'UAA dans la chaîne protéique, puis poursuivre la traduction de la protéine entière.

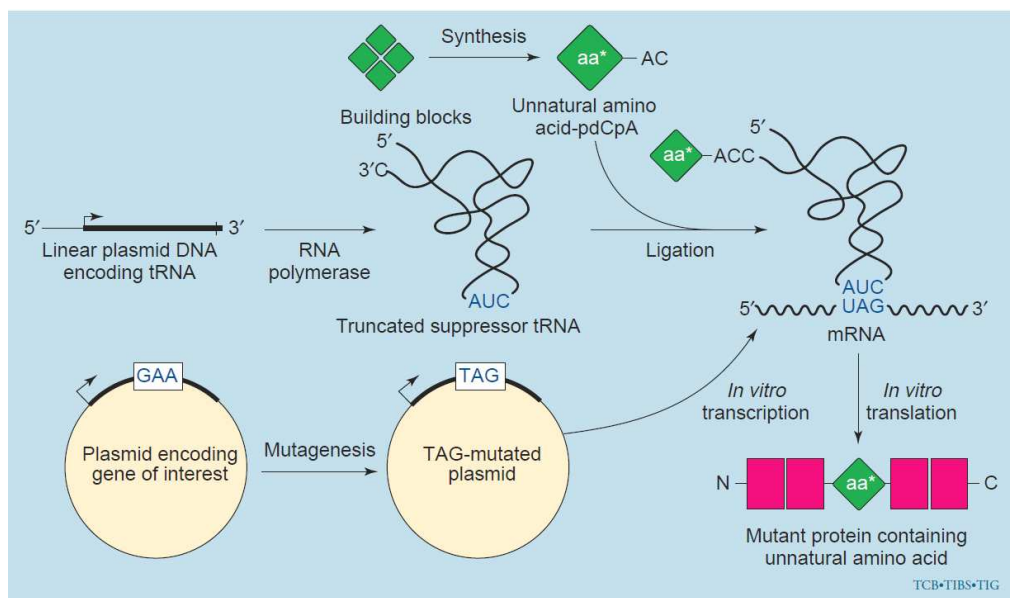


Figure 4.1. Stratégie initialement développée pour l'incorporation d'un UAA à un site spécifique d'une protéine. Cette technique implique la substitution d'un codon non-sens TAG au triplet codant le résidu d'intérêt. L'ARNt-suppresseur aminoacylé, obtenu par synthèse chimique, est ajouté à la réaction de synthèse in vitro de la protéine à partir du gène muté, afin d'incorporer l'UAA dans la séquence protéique. (pdCpA pour 5'-phospho-2-deoxycytidylyl (3',5') adénosine). *De Martin & Schultz, 1999*

L'étape clé est l'aminocyclation de l'ARNt-suppresseur avec l'UAA désiré (Fig. 4.1). Il faut tout d'abord synthétiser séparément : 1) l'ARNt-suppresseur, privé de ses deux derniers nucléotides C et A ; 2) un dinucléotide, le 5'-phospho-2'-deoxyribocytidylylriboadenosine (pdCpA) ; 3) l'UAA d'intérêt préalablement protégé par un groupe azoté, photo-labile (NVOC, Noren et al., 1989) ou I₂-labile (4-PO, Heckler et al., 1984). Le dinucléotide est ensuite lié à l'UAA protégé puis l'ensemble est attaché à l'ARNt tronqué par la ligase T₄-ARN. L'ARNt-suppresseur aminocyclé ainsi formé est alors déprotégé et injecté directement dans l'ovocyte de *Xénope*, simultanément à l'ARNm contenant le codon UAG. Un à trois jours sont nécessaires avant que la synthèse protéique, l'assemblage et le transport vers la membrane plasmique, dans le cas de protéines membranaires, ne soient accomplis.

Cette méthode de mutagenèse d'UAAs, avec synthèse chimique de l'ARNt aminocyclé, a été développée et utilisée essentiellement par Dougherty et Lester. Son principal attrait est lié à la possibilité d'incorporer un nombre quasi illimité d'UAAs dans les protéines. A ce jour, pas moins de soixante UAAs ont été incorporés dans des protéines variées (Fig. 4.2). Cependant, bien que polyvalente, puissante et prometteuse, cette technique n'a été que très peu popularisée. En effet, l'incorporation d'UAAs n'a d'abord été possible qu'*in vitro*, ce qui limite considérablement le champ d'applications. Ces dernières décennies, beaucoup d'efforts ont été produits pour faire progresser cette technique et l'appliquer dans des cellules vivantes. Le premier système cellulaire pour lequel la mutagenèse d'UAAs s'est révélée possible est l'ovocyte de *Xénope* (Nowak et al., 1995), un système d'expression classiquement utilisé pour l'étude des canaux ioniques et récepteurs ionotropiques (LGICs). Depuis lors, divers UAAs ont été introduits avec succès dans des LGICs et canaux ioniques, exprimés en ovocytes de *Xénope*, grâce à des ARNt-suppresseurs chimiquement modifiés. L'ovocyte de *Xénope* est un système d'expression idéal car son diamètre important (environ 1 mm) rend possible les micro-injections des différents ADNc et autres ARNt. Malheureusement, cette contrainte liée à la taille adéquate du système d'expression, rend difficile le transfert de la technique à des cellules plus petites telles que les neurones. Une autre limitation majeure de cette méthode est liée à l'ARNt-suppresseur, dont l'aminocyclation nécessite de nombreuses étapes de synthèse chimique, longues, laborieuses et peu efficaces. Enfin, la déacylation définitive de cet ARNt (il n'est pas rechargé) au cours de la synthèse protéique, constitue un handicap majeur à la transposition de cette technique à des conditions *in vivo*.

Annu. Rev. Biochem. 2010.79:413-444. Downloaded from www.annualreviews.org by CNRS-Multi-Site on 01/03/14. For personal use only.

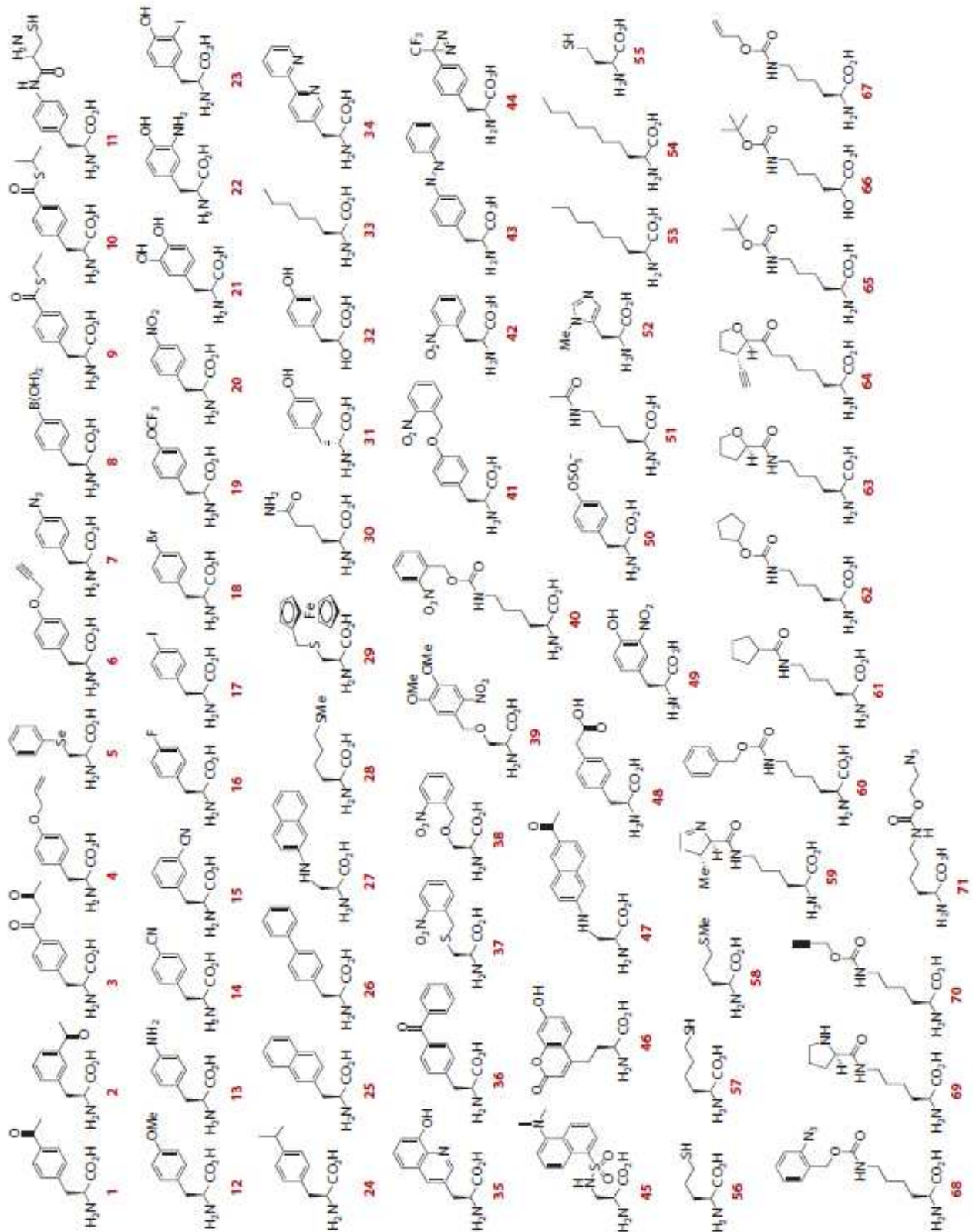


Figure 4.2. Structure chimique des différents UAAs encodés génétiquement jusqu'à aujourd'hui.

De Liu & Schultz, 2010.

4.1.2 Concept d'expansion du code génétique

Le passage d'une approche *in vitro*, nécessitant de la synthèse chimique, à une approche "tout-génétique" s'est fait grâce au développement d'une méthode innovante : l'expansion du code génétique. L'idée principale de cette approche est de s'affranchir de la synthèse chimique *in vitro*, qui était nécessaire pour aminoacyler l'ARNt-suppresseur. Avec l'expansion du code génétique, cette étape d'aminocyclation est réalisée *in situ*, par la machinerie cellulaire de traduction.

Au début des années 2000 est née l'idée de "fournir" à la cellule, non seulement l'ARNt, mais aussi l'enzyme aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS), capable d'aminocycler l'ARNt *in situ* (Kiick et al., 2002 ; Kohrer et al., 2001 ; Liu et al., 1997). Son substrat, l'acide-aminé non naturel, est ajouté en large excès au milieu de culture (Fig. 4.3). En 2001, le groupe mené par P.Schultz fut le premier à développer des paires orthogonales d'ARNt-suppresseur et de tyrosine-ARNt synthétases mutées (et dérivées d'une bactérie archée *Methanococcus jannaschii*) capables d'introduire des UAAs (dérivés de la tyrosine) dans la bactérie *E.Coli*. (Wang & Schultz, 2001) (Fig. 4.4). Leur succès s'est construit sur l'identification de paires orthogonales incompatibles avec les ARNt et aaRS endogènes : d'une part, l'aaRS introduite ne doit ni reconnaître des acides-aminés naturels comme substrats, ni aminoacyler des ARNt endogènes, et d'autre part, l'ARNt-suppresseur ne doit pas être aminoacylé par des synthétases endogènes (Davis & Chin, 2012). Cette identification de paires orthogonales peut être longue et complexe. Jusqu'à présent, seule une dizaine de paires ont été développées pour l'incorporation d'UAA dans les cellules de mammifère (Liu & Schultz, 2010). Des méthodes alternatives, basées sur la transformation de synthétases existantes, sont à l'étude afin d'augmenter la sélectivité des paires orthogonales. La stratégie la plus efficace pour générer des paires orthogonales ARNt/aaRS est de les importer d'organismes phylogénétiquement distants (par exemple, de l'*Archaea* à *E.coli*, de *E.coli* à la levure, de l'*Archaea* aux cellules de mammifères, etc). L'expansion du code génétique a été développée progressivement dans différents organismes cellulaires, dont la levure (Chin et al., 2003 ; Kohrer et al., 2001), les cellules de mammifère (Sakamoto et al., 2002 ; Wang et al., 2007, 2009 ; Ye et al., 2008), les cellules souches neurales (Shen et al., 2011), les cellules d'insecte (Mukai et al., 2010), et plus récemment les ovocytes de *Xénope* (voir Résultats 2.1 ; Ye et al., 2013). Ces deux dernières années, l'expansion du code génétique a pu être appliquée à des organismes multicellulaires,

notamment invertébrés : le ver *Caenorhabditis elegans* (Greiss & Chin, 2011 ; Parrish et al., 2012) et la drosophile *Drosophila* (Bianco et al., 2012). Un article récent publié dans *Neuron* a également montré, qu'il était possible d'utiliser cette méthode non seulement dans des neurones d'hippocampes de rat en culture, mais aussi in vivo, dans des neurones du néo-cortex d'embryons de souris (Kang et al., 2013).

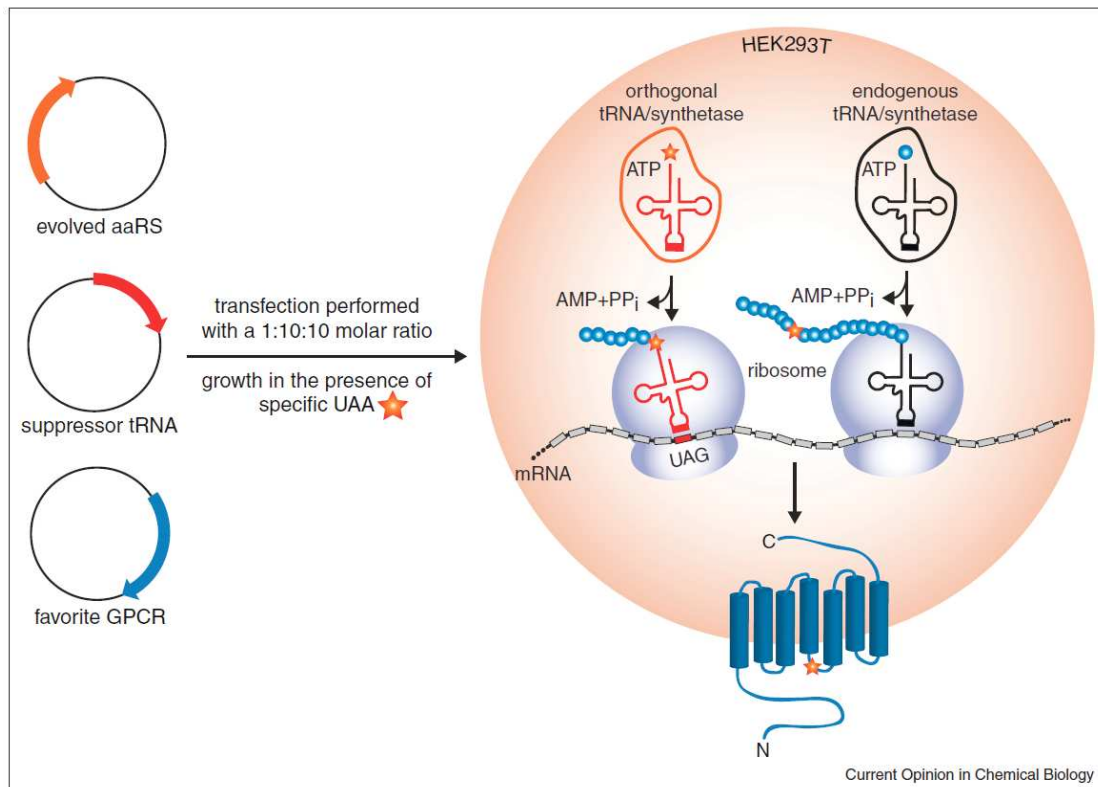


Figure 4.3. Méthodologie pour encoder génétiquement un UAA dans une protéine (ici un récepteur couplé aux protéines G (RCPG)). Des cellules HEK293T sont cotransfectées avec trois plasmides distincts portant respectivement : le gène de l'aminoacyl-ARNt-synthétase (aaRS) de *E.coli* ; le gène de l'ARNt de *B.stearothermophilus*, pour lequel l'anticodon reconnaît le triplet UAG (la séquence d'initiation en 5' de l'ARNt est humaine, et l'extrémité 3' contient la séquence de terminaison) ; et le gène codant le RCPG d'intérêt avec la mutation ponctuelle TAG à la position choisie. Lors de la traduction de la protéine, en présence de l'UAA (dans le milieu de culture) correspondant à l'aaRS utilisée, il y a lecture du codon-stop ambré, ce qui permet la synthèse d'une protéine entière. De Daggett & Sakmar, 2011.

Trois éléments essentiels déterminent l'efficacité et le rendement de l'incorporation d'un UAA : 1) la présence du codon-stop UAG, 2) l'ARNt-suppresseur qui reconnaît le codon stop ambre, 3) l'aminocyl-ARNt synthétase orthogonale, qui reconnaît l'ARNt-suppresseur et l'UAA (Fig. 4.3). Afin d'encoder un nouvel acide-aminé dans un organisme, il est nécessaire de disposer d'un codon-stop qui spécifie exclusivement l'UAA d'intérêt. Le code génétique naturel contient 61 codons permettant de traduire les 20 acides-aminés communs et trois codons non-sens, UAG, UAA et UGA, pour lesquels aucun ARNt n'est attribué et qui sont donc utilisés pour arrêter la synthèse de la protéine en cours de formation. Le codon-stop ambre est le moins courant des trois codons-stop dans la bactérie *E.coli* et les levures. C'est la raison pour laquelle il a été réassigné aux acides-aminés non-naturels (Cropp & Schultz, 2004).

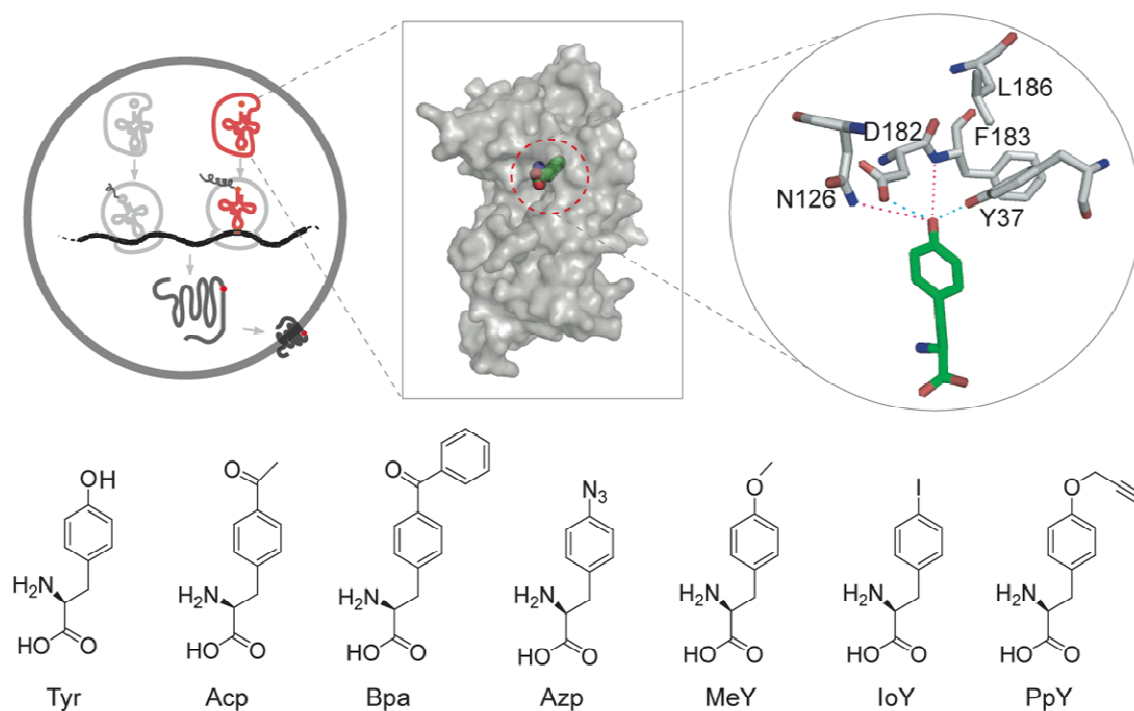


Figure 4.4. Incorporation de dérivés de la tyrosine par expansion du code génétique. A droite. Les composants endogènes de la machinerie de traduction (aa-RS, ARNt, ribosome) sont colorés en gris, tandis que les éléments exogènes, l'enzyme et l'UAA, sont représentés en rouge. Les gènes de l'aa-RS orthogonale, de l'ARNt-suppresseur et de la protéine d'intérêt ayant la mutation "codon-stop ambre", sont fournis à la cellule par transfection ou injection. L'UAA (représenté par un point rouge) est présent dans le milieu cellulaire. La chaîne polypeptidique nouvellement traduite, avec l'UAA incorporé à la position choisie, est ensuite assemblée et transportée vers la surface de la cellule. **Au**

milieu. Représentation de la surface 3D semi-transparente de la structure cristallographique de la Tyr-RS de *E.coli* (pdb 1X8X), à partir de laquelle les synthétases orthogonales sont dérivées. La tyrosine établit des contacts essentiels avec Y37, N126, D182, F183 et L186 de la Tyr-RS, ces résidus formant la poche de liaison de cette tyrosine. Muter ces acides-aminés permet d'obtenir des variants d'aaRS qui reconnaissent comme substrat les six types d'analogues de la tyrosine, dont les structures chimiques sont représentées en bas de la figure, (Chin et al., 2003).

Les ARNt synthétases n'ont pas été les seuls éléments de la machinerie de traduction à avoir suscité de l'intérêt (Fig. 4.4). Ainsi, bien que le codon-stop ambre (UAG) soit le plus largement utilisé dans le processus d'incorporation d'UAA, les codons ocre (UAA) et opale (UGA) ont aussi été utilisés (Liu & Schultz, 2010). Pour chacun, la suppression du codon-stop est en compétition avec d'autres mécanismes, notamment l'arrêt de la synthèse protéique par les facteurs de terminaison (RF). Des stratégies ont d'ailleurs été développées afin de moduler les niveaux de RF (Ryu & Schultz., 2006) en utilisant des ribosomes orthogonaux (Neumann et al., 2010), ce qui permet d'augmenter l'efficacité de l'incorporation d'UAAs pendant la traduction de la protéine en minimisant les mécanismes compétitifs. En incorporant génétiquement l'ensemble de ces éléments modifiés dans des organismes cellulaires, des organismes avec "un code génétique étendu" ont finalement été créés.

4.2 Applications biologiques de l'expansion du code génétique

La possibilité d'incorporer des UAAs dans les protéines à des sites prédéfinis, et l'étude des fonctions de ces protéines modifiées, a séduit les scientifiques pour qui l'étude des mécanismes biologiques se heurtait aux limites des méthodes classiques. Progressivement, l'approche basée sur l'expansion du code génétique s'est montrée appropriée et complète à présent de plus en plus les méthodes traditionnelles (Liu & Schultz, 2010) (Fig 4.5).

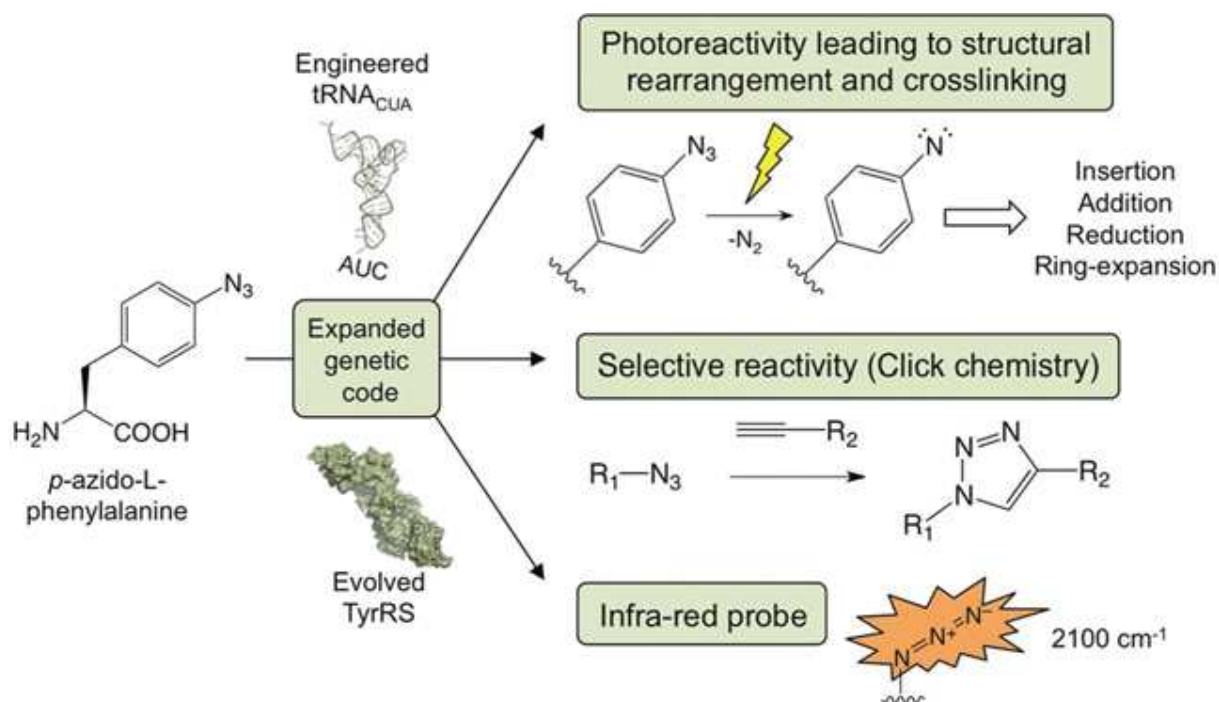


Figure 4.5. La *p*-azido-L-phenylalanine (AzF) : une sonde chimique particulièrement intéressante pour l'étude des protéines. La présence de l'AzF ouvre de nouveaux moyens d'investigation de la protéine mutée. L'AzF photo-réactif se transforme en nitrène après irradiation aux UVs. Le diradical peut notamment interagir avec les chaînes latérales de résidus voisins (photo-pontage). La cycloaddition entre le groupement azide de l'AzF et un alcyne linéaire ou cyclique permet d'attacher des fluorophores à l'UAA ("click chemistry"). Enfin, le groupement azide de l'AzF, dont la signature vibrationnelle est distincte des vibrations intrinsèques des protéines, constitue une excellente sonde pour la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR). *De Reddington et al., 2013.*

4.2.1 Etude des interactions protéine-protéine et protéine-ligand

Dans la plupart des mécanismes biologiques, déterminer les interactions d'une protéine avec son environnement, un ligand ou une autre protéine, est un défi. Ce défi est d'autant plus difficile à résoudre pour les protéines membranaires ou lorsque les interactions sont faibles, transitoires, peu spécifiques, sensibles au pH ou intracellulaires. Grâce à l'encodage génétique d'UAAs photo-réactifs, qui peuvent interagir avec des molécules voisines en réponse à une lumière de longueur d'onde donnée, de nouvelles interactions protéine-protéine peuvent être définies (Fig. 4.5). Jusqu'à présent, on dénombre trois types d'UAAs photo-réactifs, les

benzophénones (notamment la *p*-benzoyl-L-phénylalanine (Bpa)), les dérivés azides de la phénylalanine (comme la *p*-azido-L-phénylalanine (AzF)) et les dérivés de diazirine. Les deux premiers, Bpa et AzF, sont illustrés en figure 4.2 et 4.4. Ces UAAs photo-réactifs sont incorporés génétiquement à un site précis de la protéine d'intérêt, puis la protéine est irradiée avec une lumière ultraviolette (UV) dans des conditions physiologiques adaptées. Les partenaires de liaison potentiels, à proximité de l'UAA photo-réactif, sont alors susceptibles de former une liaison covalente avec l'UAA. Cela permet d'identifier des facteurs biologiques capables d'interagir avec la protéine d'intérêt.

Le photo-pontage via l'UAA Bpa a notamment été utilisé pour définir les interactions entre les protéines chaperonnes GroEL et leurs substrats (Liu et al., 2010), et identifier les interactions protéiques importantes pour la régulation du cycle cellulaire. La méthode a aussi été utilisée pour définir les interactions protéiques dans les membranes plasmiques des cellules de mammifères (Hino et al., 2011) et dans les membranes du réticulum endoplasmique (RE) des levures. L'utilisation de cette approche pour étudier les interactions entre les translocons bactériens SecY-SecE-SecG (SecYEG) exprimés à la membrane, et la protéine SecA, a permis de montrer comment des interactions protéiques dans un complexe macromoléculaire pouvaient en influencer les changements conformationnels qui, *in fine*, conduisent à la translocation de la protéine (Mori & Ito, 2006) (Fig. 4.6.).

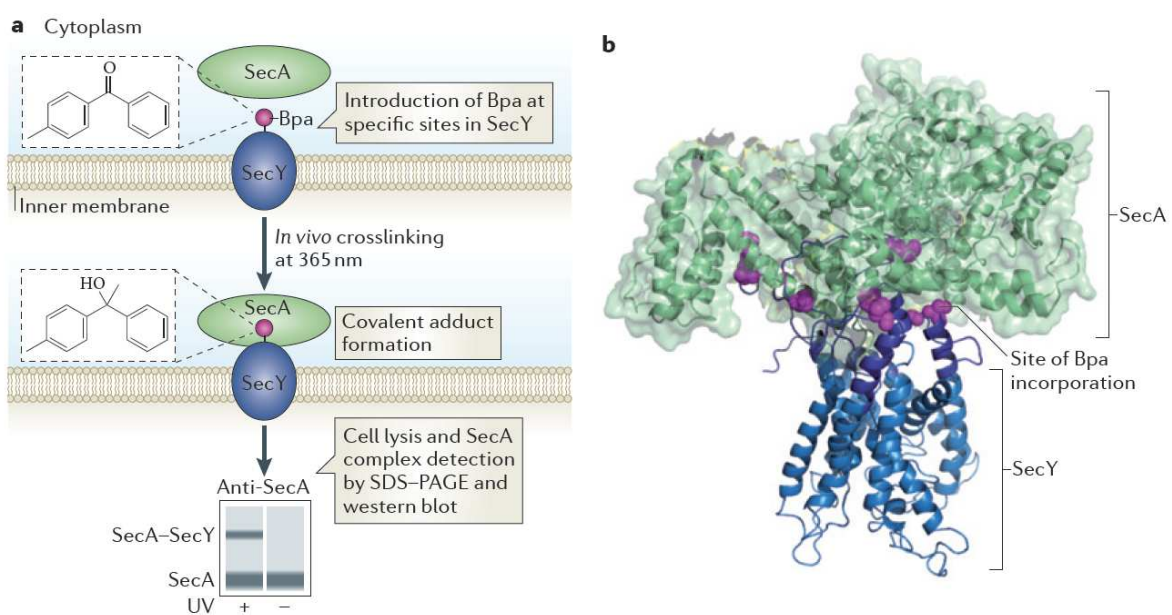


Figure 4.6. Etude des interactions entre SecA et SecY du translocon bactérien SecY-SecE-SecG par incorporation de l'UAA pontant Bpa. Le Bpa a été introduit à 53 positions différentes de la boucle cytoplasmique de SecY. Après exposition aux UVs, le photo-pontage entre le Bpa et la protéine SecA a pu être détecté par western-blot, avec des anticorps dirigés contre SecA. Un modèle par homologie du complexe SecY-SecA de *E.coli* a été construit, avec les positions d'incorporation et de photo-pontage du Bpa représentées en violet. *De Davis et Chin, 2012.*

L'incorporation d'un dérivé de diazirine dans la protéine adaptatrice GRB2, exprimée en cellules HEK293, a permis d'identifier de nouveaux partenaires de liaison de la GRB2, qui n'auraient pas pu être détectés par des méthodes conventionnelles d'immunoprécipitation (Hino et al., 2011). Dans cette étude, la diazirine-Phe a été encodée au niveau du domaine SH2 de la GRB2. Des cellules mutantes ont été irradiées, après stimulation des EGFRs (récepteurs du facteur de croissance épidermique) qui induit des interactions entre la GRB2 et des protéines des voies de signalisation. En combinant cette approche à la spectrométrie de masse, deux protéines associées (GIT1 et AF6) et les ribonucleoprotéines hétérogènes F, H1 et H2, ont été identifiées comme de nouveaux partenaires directs de la GRB2.

L'incorporation d'UAAs photo-réactifs dans une protéine se fait avec un très bon rendement, ce qui favorise l'expression et la purification d'un nombre suffisant de mutants pour des études cristallographiques. Deux études menées sur des protéines photo-pontées exprimées dans *E.coli* ont révélé les structures de "photo-pontage". Ainsi, la structure du complexe formé par le domaine C-terminal de la protéine proteasomal S6 et la gankyrine, oncoprotéine du foie, ayant incorporé le Bpa, a été résolue avec une précision de 2.05 Å (Sato et al., 2011). Elle a révélé que le groupe carbonyle de la benzophénone du Bpa incorporé dans la gankyrine, formait une liaison covalente uniquement avec le carbone C γ du résidu Glu356 de S6, prouvant ainsi la sélectivité du Bpa (Fig. 4.7). Par ailleurs, dans une étude récente, le photo-pontage entre l'AzF inséré dans la GFP, et le chromophore, a été révélé par la structure cristallographique obtenue à une résolution de 1.45 Å (Reddington et al., 2013).

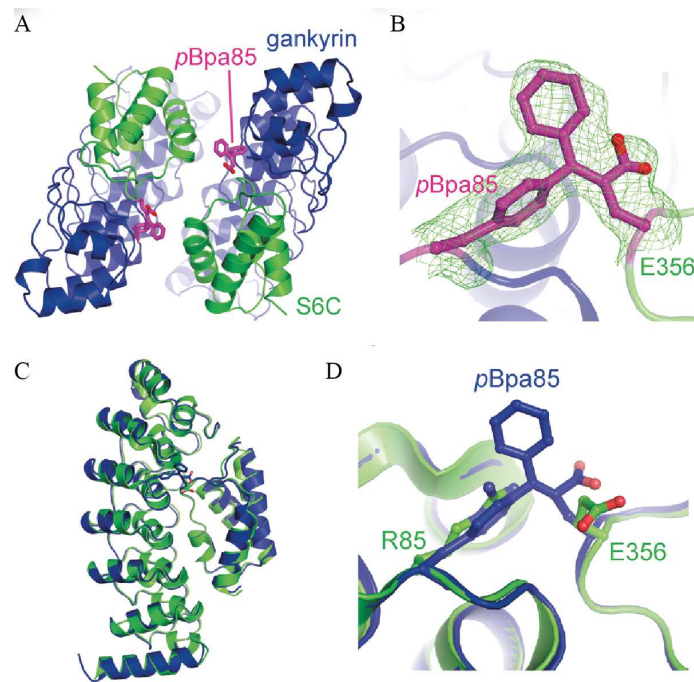


Figure 4.7. Crystallisation de la liaison entre la région C-terminale de la protéine et l'acide-aminé non-naturel Bpa introduit dans la gankyrin (pdb 2DVW ; 2.05 Å). **A.** Superposition de deux complexes, gankyrine (bleu)-Bpa (rouge) / S6C (vert). **B.** Vue de dessus du site de pontage. La carte de densité électronique est colorée en vert. Le Bpa, ponté à la chaîne latérale de S6C est coloré en magenta. **C.** Superposition des structures du complexe photo-ponté (bleu) et du complexe natif (vert). **D.** Superposition des sites de pontage. Les codes couleur sont les mêmes dans toute la figure. *De Sato et al., 2011*

4.2.2 Détection de changements conformationnels

Utilisation d'UAAs fluorescents

L'introduction de sondes fluorescentes dans les protéines constitue un outil très puissant pour étudier la structure et les fonctions d'une protéine, *in vitro* ou *in vivo*. Une méthode particulièrement adéquate implique la fusion génétique de la protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente. Cependant, la taille de ces protéines fluorescentes (> 20 kDa) et les

contraintes liées à la fusion limitent leur utilisation comme sonde locale d'une structure protéique. L'incorporation d'acides-aminés fluorescents directement dans la protéine permet de remédier à ces problèmes.

Ainsi, en 2006, Wang et al. parviennent à encoder un acide-aminé attaché au fluorophore coumarine, dans *E.coli*, et à l'utiliser pour étiqueter la protéine chaperonne GroEL. Les fusions entre GroEL et la GFP sont problématiques lorsqu'on veut localiser GroEL par imagerie car elles interfèrent avec les fonctions de GroEL. A contrario, le complexe GroEL-Coumarine est fonctionnel et permet de localiser la protéine GroEL durant le stress oxydatif et les chocs thermiques. En 2009, Lee et al., ont montré que l'UAA fluorescent Anap (3-(6-acetylnaphtalen-2-ylamino)-2 aminopropanoic acid) pouvait être incorporé dans les levures avec un bon rendement et une grande fidélité et ainsi servir de sondes locales permettant de détecter les changements conformationnels d'une protéine. L'Anap est plus sensible à son environnement que les UAAs couplés à la coumarine et présentent une intensité de fluorescence plus importante. Incorporé génétiquement dans la protéine de liaison de la glutamine (QBPs), exprimée dans une *E.coli*, l'Anap a permis d'évaluer de façon directe des changements structuraux locaux induits par la liaison du ligand (Lee et al., 2009).

Mais c'est en 1996 que Turcatti et al. décrivent pour la première fois l'incorporation d'un UAA fluorescent, le NBD-Dap, dans une protéine membranaire, le RCPG neurokinin NK2 ((tachykinin)-2 receptor), exprimé dans des ovocytes de *Xénope* (Turcatti et al., 1996). Les auteurs sont aussi les premiers à déterminer, par des mesures de FRET (transfert d'énergie par résonance) les distances intermoléculaires entre un antagoniste étiqueté avec le fluorophore TMR et l'UAA fluorescent, introduit à diverses positions du RCPG. Ces UAAs fluorescents, dont les plus utilisés sont le L-(7-hydroxycoumarin-4-yl)ethylglycine, la dasyalalanine, le (S)-1-carboxy-3-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)propan-1-aminium (CouAA) et le 3-(6-acetylnaphtalen-2-ylaminio)-2-aminopropanoic acid (Anap), présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux protéines fluorescentes classiques (FP, dérivées de la GFP). En particulier, ces UAAs sont plus petits et limitent donc les perturbations (structurales et fonctionnelles) liées à leur incorporation dans la protéine. Ils peuvent être incorporés à n'importe quel site de la protéine, alors que la fusion des FPs est souvent limitée aux extrémités N- et C-terminales de la protéine cible.

Récemment, T. Kalstrup et R. Blunk (2013) ont tiré profit des propriétés fluorescentes de l'UAA Anap pour étudier la dynamique des changements conformationnels subis par le canal potassique Shaker lors de son activation (Fig. **4.8**). Une des techniques utilisée pour étudier simultanément les changements conformationnels d'une protéine et son activité en temps réel est la fluorométrie couplée à la mesure de courants en potentiel imposé ("Voltage-Clamp Fluorometry" ou VCF). Toutefois, la VCF classique repose sur la mesure de la fluorescence émise par un fluorophore qui est accroché à une cystéine préalablement introduite dans la protéine. Elle nécessite donc un accès direct aux cystéines. C'est pourquoi la VCF est généralement limitée à l'étude de sites extracellulaires. Or, dans le cas des canaux potassiques par exemple, les régions essentielles à l'activation sont localisées du côté cytosolique du canal et sont donc inaccessibles. Grâce à l'incorporation de l'UAA fluorescent Anap (Fig. **4.8.B et C**), les auteurs ont pu appliquer la technique de VCF à des sites intracellulaires, en l'occurrence à diverses positions à l'intérieur du canal potassique Shaker (Fig. **4.8.A**). Cette approche, qui permet de mettre en relation les changements de fluorescence et les variations du potentiel lors de l'activation du canal (Fig. **4.8.D**) a contribué à améliorer nos connaissances des mécanismes aboutissant à l'ouverture du canal Shaker.

Cette technique basée sur l'incorporation d'acides-aminés fluorescents présente de nombreux avantages notamment dans le cas de récepteurs ou de canaux ioniques, lorsque la simple analyse de structures cristallographiques statiques et de simulations de dynamiques moléculaires montre ses limites. En effet, ces techniques ne permettent pas d'associer directement des informations structurales avec des données fonctionnelles obtenues en électrophysiologie, ce qui permettrait d'accéder aux changements conformationnels du canal durant les phases d'activation et d'inactivation. Ces UAAs fluorescents, sensibles au microenvironnement entourant un résidu particulier, peuvent servir d'indicateurs de la dynamique de la protéine.

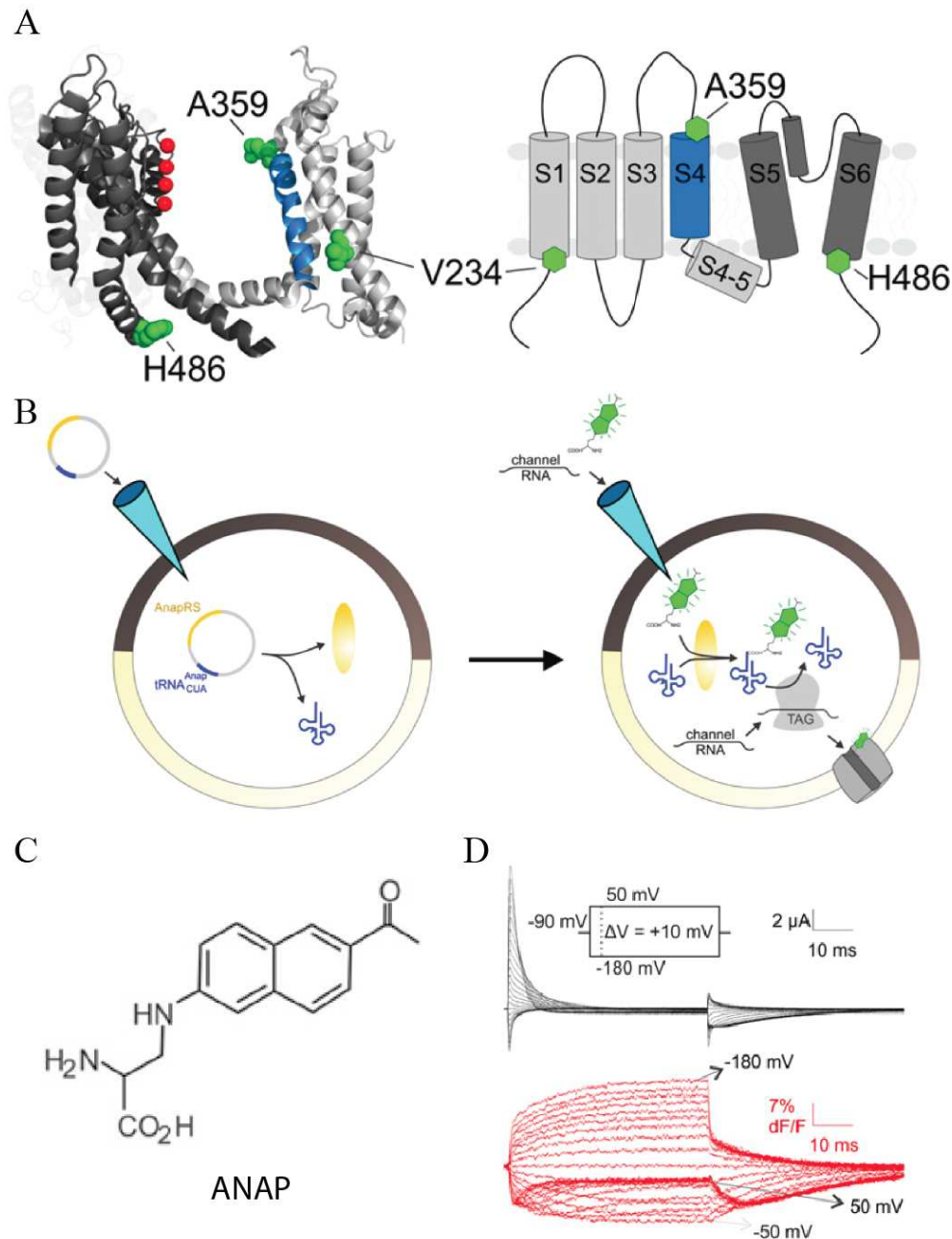


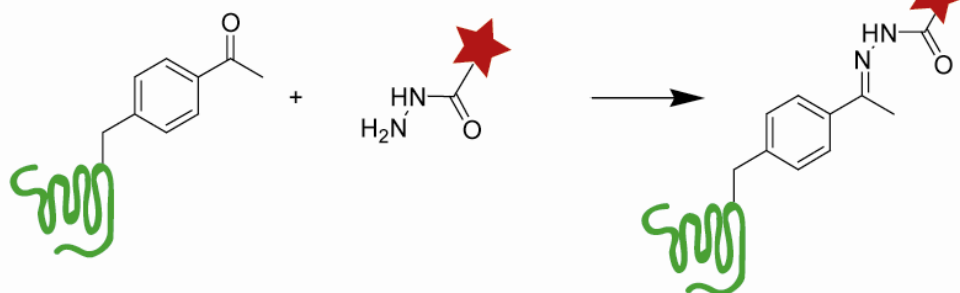
Figure 4.8. Utilisation de l'acide-aminé non-naturel fluorescent Anap pour des études de fluorométrie à potentiel imposé ("Voltage-Clamp Fluorometry") sur le canal potassique Shaker. **A.** Structure d'une chimère Kv1.2/2.1 (pdb 2R9R, deux sous-unités) et topologie (segments transmembranaires S1-S6) d'un canal potassique. Les positions des mutations sont colorées en vert et les ions K^+ , dans le filtre de sélectivité, en rouge. **B.** Méthode d'expression de la protéine ayant incorporé l'UAA fluorescent, dans un ovocyte de *Xénope*. Le plasmide exprimant l'AnapRS et l'ARNt-suppresseur correspondant sont d'abord injectés, puis le jour suivant, l'ARNm codant pour le canal et l'UAA fluorescent sont à leur tour injectés, ce qui conduit à la synthèse de la protéine avec l'UAA incorporé à la position voulue. **C.** Structure chimique de l'Anap. **D.** Réponse des canaux ayant la mutation A359Anap, en fluorescence (rouge) et en courant (noir), à des "pulses" d'UVs appliqués à partir de -90 mV jusqu'à des potentiels compris entre -180 mV et +50 mV. D'après Kalstrup et al., 2013.

Utilisation des UAAs pour l'attache de sondes biophysiques

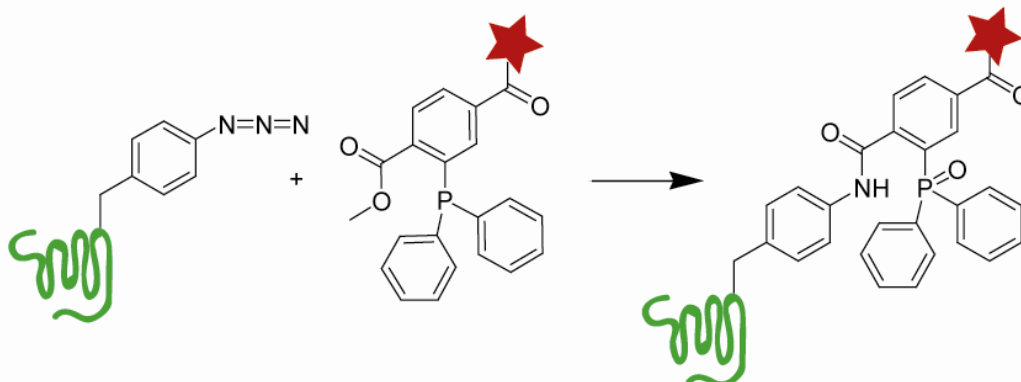
Historiquement, les réactions de conjugaison de protéines impliquent la modification d'une lysine ou d'une cystéine par des agents électrophiles, mais elles conduisent le plus souvent à des mélanges hétérogènes de protéines. L'introduction de groupes fonctionnels orthogonaux permet un contrôle précis des sites de conjugaison et de la stœchiométrie. Diverses méthodes existent, dont les plus classiques sont les réactions enzymatiques ou chimiques qui introduisent des étiquettes dans les séquences peptidiques. Un UAA incorporé dans une protéine peut également servir aux réactions de conjugaison bio-orthogonales. Cette approche est attractive, car, a priori, l'UAA peut être introduit à n'importe quelle position dans n'importe quelle protéine ; il perturbe peu la structure de la protéine ; il n'interfère pas ou peu avec ses fonctions et sa localisation ; et les protéines modifiées sont exprimées en système recombinant, levures, bactéries, cellules de mammifère, avec un très bon rendement. La seule difficulté de cette méthode est de réussir à s'affranchir au maximum du bruit de fond dû aux fluorophores libres ou attachés de façon non spécifique.

L'UAA incorporé peut être lié à diverses sondes biophysiques, fluorescentes, RMN ou infrarouges qui agissent alors comme des étiquettes photo-réactives permettant de renseigner sur la localisation de la protéine, son transport, son environnement chimique à proximité de la sonde, des changements conformationnels ou des interactions avec d'autres protéines (Davis & Chin, 2012). Ces sondes sont généralement introduite par l'intermédiaire de réactions de conjugaison bio-orthogonales (Huber et al., 2013) (Fig.4.5, 4.9) : entre autre, la réaction de Staudinger-Bertozzi, entre un groupement azide et des dérivées de phosphine (Fig. 4.9.B) et la réaction de cycloaddition entre un alcyne cyclique contraint et un groupement azide (Fig. 4.9.C). Ces réactions aboutissent à la modification spécifique d'un UAA, l'AzF, par un fluorophore. Les azides, pour leur signature vibrationnelle unique (distincte des vibrations intrinsèques des protéines) sensible à la polarité et aux champs électriques, constituent aussi d'excellentes sondes pour la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Fig. 4.5). L'incorporation d'un dérivé azide de la phénylalanine (AzF) au niveau des hélices transmembranaires de la rhodopsine, le RCPG responsable de la vision en faible luminosité, combinée à la FTIR, a été utilisée pour examiner les changements conformationnels locaux accompagnant l'isomérisation du récepteur lors de sa photo-activation (Ye et al., 2010).

(A) Hydrazone ligation at a keto group



(B) Staudinger-Bertozzi ligation at an azide group



(C) [3+2] cycloaddition (click chemistry) at an azide group

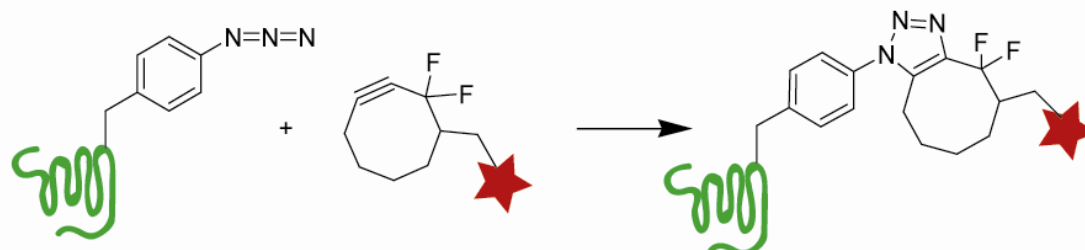


Figure 4.9- Réactions de conjugaison impliquant une fonction cétone (A) ou une fonction azide (B) et (C) et permettant d'attacher un fluorophore à l'UAA. **A.** Formation d'un hydrazone par réaction entre la fonction cétone et une hydrazine substituée. **B.** La réaction de Staudinger-Bertozzi a lieu entre un groupement azide et un dérivé de la phosphine. **C.** La réaction de cyclo-addition implique un groupement azide et un alcyne linéaire (en présence de Cu(I) catalyseur) ou un alcyne cyclique (cyclooctyne par exemple).

4.2.3. Contrôle de l'état d'activation d'une protéine avec des UAAs photo-cagés

La fonction d'une protéine peut être abolie en remplaçant un résidu, à un endroit bien précis, par une version non-naturelle photo-cagée de ce même acide-aminé, cette modification bloquant alors une fonction particulière de la protéine. Une brève application (milliseconde) de lumière est alors utilisée pour décager l'UAA et ainsi restaurer la fonction de la protéine. Un avantage majeur de cette approche est qu'elle permet d'activer rapidement et sélectivement une protéine spécifique, dans des cellules et organismes vivants. Contrôler ainsi l'activation d'une protéine aide à en mieux connaître les mécanismes. Avant que l'approche par expansion du code génétique ne soit développée, les UAAs photo-cagés étaient incorporés dans les protéines par l'intermédiaire d'ARNt chimiquement modifiés (voir Introduction 4.1.1). Des travaux précurseurs réalisés par P. Schultz et collègues ont permis d'incorporer une sérine cagée à une position cruciale du système d'auto-épissage par l'intéine, et d'évaluer le rôle de cette sérine par décageage photo-contrôlé. Dans le système ras-GAP, un aspartate cagé a été utilisé pour réguler les interactions protéine-protéine (Pollitt & Schultz, 1998).

Les UAAs photo-cagés ont été également utilisés pour l'étude des canaux ioniques. Ainsi, les tyrosines, sérines, et lysines cagées se sont montrées particulièrement prometteuses pour évaluer le rôle de la phosphorylation des chaînes latérales des acides aminés dans les fonctions d'un canal ionique. La modulation des canaux ioniques et des récepteurs aux neurotransmetteurs par des kinases joue probablement un rôle dans la plasticité synaptique. Dans une étude conduite par Daugherty, Lester et leurs collègues, une tyrosine cagée a été incorporée à la place d'une tyrosine conservée, dans le canal potassique Kir 2.1 (Tong et al., 2001). Lorsque les tyrosines kinases sont actives, le photo-décageage de cette tyrosine conduit à la fois à une inhibition des courants K^+ et à une diminution significative de la capacitance du canal, ce qui implique une augmentation de l'endocytose des canaux potassiques. Ces résultats démontrent le rôle de la phosphorylation de la chaîne latérale de cette tyrosine dans la signalisation intracellulaire et *in fine* dans son auto-régulation.

De même la libération par la lumière de sérines cagées a mis en évidence la contribution de la phosphorylation du facteur de transcription de levure Pho4 à son export

depuis le noyau (Lemke et al., 2007). Enfin, concernant les lysines photo-cagées (Hancock et al., 2010; Chen et al., 2009; Gautier et al., 2011), leur incorporation dans des protéines exprimées dans des cellules de mammifère a démontré la possibilité de contrôler, par la lumière, la localisation nucléaire de ces protéines (Gautier et al., 2010). L'incorporation de cette même lysine cagée dans des MEKs (de la voie de signalisation des MAP kinases) a permis de créer une version activable par la lumière de ces protéines et de préciser les voies de signalisation par les MAP kinases (Gautier et al., 2011).

4.2.4 Etude des modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles modulent l'activité de la plupart des protéines eucaryotes. En effet, après la traduction, les modifications d'acides-aminés permettent d'élargir la gamme de fonctions d'une protéine, en lui ajoutant un autre groupe fonctionnel (tel qu'un acétate, phosphate, divers lipides et hydrates de carbone). Ces modifications peuvent changer la nature chimique d'un acide-aminé (ex. citrullination), ou engendrer des changements structuraux (Mann & Jensen, 2003). L'approche par expansion du code génétique a permis récemment d'incorporer, à un site spécifique d'une protéine donnée, des tyrosines modifiées, par nitration (Neumann et al., 2008), sulfatation (Liu & Schultz, 2006), ou phosphorylation (Serwa et al., 2009). Par la suite, des sérines phosphorylées ont été incorporées avec succès (Park et al., 2011), de même que des lysines modifiées. Les modifications post-traductionnelles des lysines jouent un rôle important dans la régulation des fonctions de la chromatine. Ainsi, des lysines monométhylées, diméthylées (Ai et al., 2010; Groff et al., 2010; Wang et al., 2010), acétylée ou ubiquitinées (Li et al., 2009; Virdee et al., 2011; Virdee et al., 2010) ont pu être introduites avec succès dans des protéines recombinantes, grâce à l'approche basée sur l'expansion du code génétique. Dans le cas de modifications de la lysine par monométylation et dimétylation, les expériences ne servent pour l'instant qu'à prouver la faisabilité de la méthode (Nguyen et al., 2010). Pour la lysine acétylée, cette approche a permis de préciser le rôle de l'acétylation, notamment dans la régulation de la structure et de la fonction de la chromatine, ce que les méthodes traditionnelles ne permettent pas de faire aisément.

4.3 Utilisation des acides-aminés non-naturels dans l'étude des récepteurs membranaires

4.3.1. Applications aux récepteurs couplés aux protéines G

Ces dernières années, diverses approches basées sur l'incorporation d'UAAs dans un RCPG ont été développées afin d'étudier la pharmacologie et les dynamiques de ces récepteurs en système recombinant ou dans un environnement cellulaire natif. L'expansion du code génétique a notamment permis d'identifier les résidus de la poche de liaison de certains RCPGs (Huber et al., 2013). Ainsi l'incorporation des UAAs dans divers récepteurs chemokines, ont permis d'étudier les sites de liaison de différents ligands sur ces récepteurs (Grunbeck et al., 2011). Treize positions individuelles au cœur du récepteur ont été mutées en Bpa ou AzF. Après irradiation des cellules, pour favoriser le pontage avec l'antagoniste FL-T140, fusionné avec la fluoresceine (étiquette) puis purification des complexes protéines-ligands par des anticorps dirigés contre la fluoresceine et analyse par western-blots, les auteurs ont pu identifier le site précis de liaison de l'antagoniste dans la poche du récepteur. Ces résultats ont par la suite été corroborés par les structures cristallographiques du récepteur, qui ont également révélé les déterminants moléculaires de la reconnaissance ligand-protéine.

L'expansion du code génétique permet également de modifier des sites précis des RCPGs, en y introduisant des sondes fluorescentes, RMN ou infrarouges (IRs). Les dérivés azides de la phénylalanine, dont l'AzF fait partie, peuvent en effet être utilisés comme sonde IR. Combinée à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), l'incorporation de l'AzF au niveau des hélices transmembranaires de la rhodopsine (RCPG responsable de la vision nocturne), révèle les changements conformationnels locaux accompagnant l'isomérisation du récepteur lors de sa photo-activation. L'analyse des signaux de FTIR des récepteurs mutants a notamment mis en évidence le rôle de l'hélice 6 dans l'activation du récepteur (Ye et al., 2009, 2010).

4.3.2. Applications aux récepteurs-canaux

Ces deux dernières décennies, Daugherty et ses collègues ont appliqué la technique de mutagenèse des UAAs pour l'étude des fonctions des LGICs, et plus particulièrement celles des récepteurs nicotiques à acétylcholine (nAChRs). Pour l'ensemble de leurs travaux, c'est l'aminocyclation des ARNt par synthèse chimique qu'ils ont adoptée, approche qui leur a permis d'incorporer un nombre quasi illimité d'UAAs dans les protéines. Leur étude des nAChRs a ciblé deux problématiques. La première concerne l'étude des relations structure-fonction d'un acide-aminé à une position donnée, en y introduisant des groupes chimiques variables. Par exemple, l'incorporation de dérivés fluorés de la phénylalanine, de la tyrosine ou du tryptophane dans le nAChR permet de tester l'importance des interactions cation- π assurées par ces résidus dans la liaison des agonistes (Dougherty, 1996).

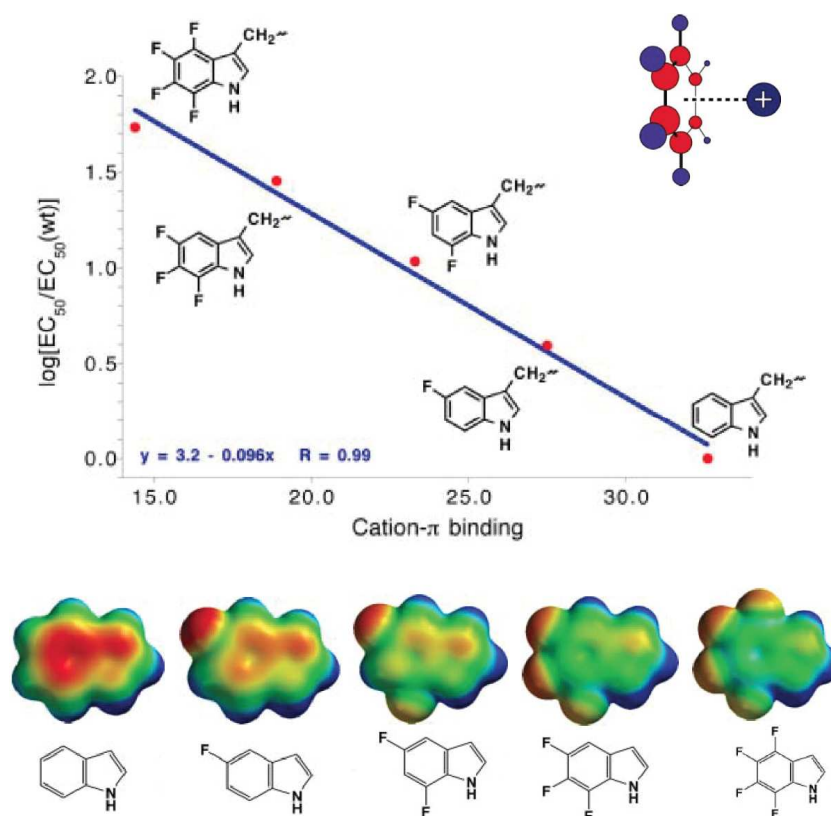


Figure 4.10. La liaison de l'acétylcholine sur le récepteur nAChR est stabilisée par des interactions cation- π entre le cycle du tryptophane et la charge positive du neurotransmetteur. *En haut.* Représentation de l'affinité du récepteur pour l'acétylcholine en fonction de l'énergie de liaison du cycle pour l'ion Na^+ (en kcal/mol). *A droite.* Représentation schématique d'une interaction cation- π . *En bas.* Surfaces de potentiel électrostatique, négatif en rouge et positif en bleu.

En effet, les neurotransmetteurs, et notamment l'acétylcholine (ACh), sont généralement chargés positivement. Dans de nombreux systèmes, cette charge positive est reconnue par un tryptophane ou une tyrosine du récepteur, avec lesquelles elle établit une interaction type "cation- π " (Fig. 4.10). Ainsi, il a été montré que neuf résidus aromatiques (Tyr et Trp) contribuaient à la liaison de l'ACh au récepteur nAChR. L'incorporation, à la place d'un tryptophane, d'un UAA fluoré dérivé du Trp, met en évidence le rôle de cette interaction cation- π dans la fixation de l'ACh dans la poche de liaison. En effet, les fluors accrochés au cycle aromatique l'appauvrissent en électrons et par conséquent, affaiblissent la liaison cation- π . Ces fluorinations déstabilisent alors l'interaction de l'acétylcholine avec son récepteur (augmentation de l' EC_{50}) (Fig. 4.10). La seconde étude s'appuie sur l'utilisation d'UAAs photo-réactifs, notamment les UAAs photo-cagés (Miller et al., 1998 ; Petersson et al., 2003 ; Philipson et al., 2001) et les UAAs photo-clivables (Hanek et al., 2010). Un acide-aminé photo-cagé a sa chaîne latérale protégée par un groupe chimique photo-amovible, tandis qu'un UAA photo-clivable, le 2-(nitrophenyl)glycine (Npg) par exemple, a sa chaîne principale "cagée". Incorporer un UAA photo-réactif à un endroit spécifique d'un LGIC permet d'étudier et de contrôler ses fonctions physiologiques en "temps réel".

4.4 Expansion du code génétique : perspectives et applications *in vivo*

La mutagenèse d'UAAs est une méthode puissante et prometteuse car elle permet d'incorporer dans une protéine de nouvelles fonctions, chimiques et biophysiques. Ainsi, l'incorporation d'UAAs dans une protéine permet d'en étudier les relations structures-fonctions et les mécanismes d'activation (par réactions de photo-pontage, décageage de ligand...) mais aussi d'élargir le champ d'application de méthodes déjà existantes (étude de fluorescence, FRET, AFM, FTIR...). Deux approches ont été développées afin de mettre en œuvre cette technique novatrice, l'une chimique, avec l'aminoacylation *in vitro* de l'ARNt, et l'autre génétique, avec la construction de paires orthogonales ARNt-suppresseur/aminoacyl-ARNt-synthétase qui permettent l'aminoacylation *in situ* de l'ARNt. Toutes deux conduisent à l'incorporation d'un UAA à un site donné de la protéine. L'une comme l'autre présente des avantages et des

inconvenients (voir Introduction **4.1.1** et **4.1.2**). Néanmoins, la première approche est limitée à des systèmes d'expression hétérologues, qui ne conviennent pas à l'étude de la signalisation neuronale et des circuits neuronaux. A contrario, l'approche d'expansion du code génétique permet l'incorporation d'UAAs à la fois dans des systèmes recombinants, dans des neurones en culture, mais aussi et surtout, *in vivo*, dans des cerveaux d'animaux par exemple.

C'est ce à quoi sont parvenus, récemment, J.Y. Kang, L. Wang et leurs coauteurs, qui ont incorporé un UAA photo-réactif encombrant, le 4.5-dimethoxy-2-nitrobenzyl-cysteine (ou Cmn), dans le pore d'un canal potassique Kir2.1 (Kang et al., 2013). Dans un premier temps, les auteurs ont exprimés ces canaux mutés en système hétérologue, dans des cellules HEK. Le Cmn est un bloqueur du pore très intéressant car, sous l'effet de l'UV, son groupe dimethoxynitrobenzyle est facilement hydrolysable en cystéine, résidu endogène qui n'interfère pas avec les fonctions du canal Kir2.1. En faisant passer le canal d'une conformation "pore bloqué" à une conformation "pore libre", sous l'effet de la lumière, les auteurs sont parvenus à contrôler l'activation de ce "PIRK" (canal potassique photo-activable, à rectification entrante), ce qui leur a donné des indications sur les relations entre la structure et l'activité du canal. L'incorporation d'UAAs photo-réactifs à un site spécifique d'une cible bien définie constitue donc ici un nouvel outil d'optogénétique, permettant d'interroger finement une fonction précise d'un récepteur. Les auteurs ont ensuite exprimé ce canal PIRK dans des neurones hippocampiques de rat. Après des applications brèves d'UVs, des courants à rectification entrante sont enregistrés et peuvent être bloqués par le baryum Ba^{2+} , preuve que ces courants sont dus à la photo-activation des canaux PIRK. L'activation de ces PIRKs conduit comme attendu à une diminution de l'excitabilité des neurones hippocampiques qui se traduit par l'arrêt des potentiels d'action. Les auteurs sont donc parvenus à contrôler par la lumière le potentiel membranaire d'un neurone. Forts de ce résultat, ils ont ensuite entrepris d'exprimer le canal PIRK *in vivo*.

L'incorporation d'UAAs *in vivo* est un défi pour les chercheurs car elle doit faire face à deux difficultés : (1) la distribution et l'expression efficaces des gènes codant pour la paire orthogonale ARNt-suppresseur/aminoacyl-ARNt-synthétase et ceux codant pour la protéine cible, dans un tissu ou une cellule spécifiques ; (2) la biodisponibilité suffisante de l'UAA dans le tissu ou la cellule-cible. Pour relever ce défi, les auteurs ont choisi de travailler sur des

embryons de souris, car il est possible d'y introduire des ADNs et des composés chimiques *in utero*, puis de préparer des tranches de cerveau, avant et après la naissance (Mulder et al., 2008 ; Saito, 2006). Les gènes codants sont dans un premier temps délivrés dans le néocortex et le diencephale de souris par électroporation *in utero* puis dans un second temps, les UAAs sont fournis au cerveau sous forme de dipeptides (qui seront hydrolysés par des peptidases intracellulaires pour libérer l'UAA), par injection dans les ventricules.

Cette méthode s'est montrée concluante puisqu'ils sont parvenus, pour la première fois, à exprimer un canal potassique photo-activable dans des neurones du néocortex et du diencephale d'embryons de souris. Les enregistrements électrophysiologiques sur des tranches de cerveau ont montré qu'il était possible de contrôler, par la lumière, l'activation d'un PIRK, et générer ainsi des courants à rectification entrante. Il s'agit là de la première application *in vivo*, dans des mammifères, de l'expansion du code génétique.

La mutagenèse d'UAAs par expansion du code génétique permet des études détaillées des canaux ioniques et des récepteurs, de leur structure et de leurs fonctions, avec une précision moléculaire raffinée. La commodité technique de cette approche, que les développements récents rendent plus abordable, devrait populariser la méthode et en élargir les applications, notamment *in vivo*.

Deuxième Partie

RESULTATS



1. ARRANGEMENT DES SOUS-UNITES AU SEIN D'UN RECEPTEUR NMDA TETRAMERIQUE

1.1. Contexte de l'étude

Après dix années d'études structurales sur les domaines de récepteurs-canaux (ou ionotropiques) du glutamate (iGluRs) isolés (NTDs et ABDs) la structure cristallographique d'un récepteur AMPA (rAMPA) GluA2 entier, publiée en 2009, a révélé comment les différentes sous-unités et chacun de leurs domaines étaient arrangés dans un iGluR tétramérique. Si certaines caractéristiques structurales essentielles de l'homotétramère GluA2 semblent être conservées dans les récepteurs NMDA (rNMDAs) (voir Introduction **2.2.6**), l'arrangement spatial des quatre sous-unités d'un rNMDA (typiquement deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2) autour du pore fait toujours débat. Etablir sans ambiguïté l'organisation tétramérique d'un rNMDA est nécessaire afin de comprendre le fonctionnement du récepteur.

1.1.1. Arrangement multimérique des récepteurs-canaux

Les récepteurs-canaux constituent une super-famille de récepteurs aux neurotransmetteurs, exprimés à la membrane plasmique et assurant un transfert rapide du signal, d'une cellule à l'autre. Ils forment des protéines multimériques constituées de trois à cinq sous-unités qui s'arrangent autour d'un canal ionique central (Fig. **1.1**). De nombreux sous-types de récepteurs-canaux sont exprimés dans différentes espèces de vertébrés et invertébrés. Cette diversité moléculaire naît des multiples associations possibles entre les sous-unités de chaque groupe de récepteurs-canaux. Elle est à l'origine d'une considérable diversité fonctionnelle, pharmacologique et physiologique (voir Introduction **1**).

Contrairement aux autres récepteurs-canaux, qui forment soit des pentamères (famille des récepteurs "cys-loop", Fig. 1.1.A) soit des trimères (récepteurs P2X, Fig. 1.1.C), les iGluRs sont des tétramères (Fig. 1.1.B ; Rosenmund et al., 1998 ; Chen et al., 1999 ; Matsuda et al., 2005 ; Nakagawa et al., 2005 ; Sobolevsky et al., 2009). Si certaines sous-unités peuvent s'assembler en homotétramères (rAMPA GluA1-4 et rKA GluK1-3) d'autres doivent obligatoirement s'associer à une sous-unité distincte pour former des récepteurs fonctionnels (GluK4 et GluK5 avec GluK1 ou GluK3; GluN2A-D et GluN3 avec GluN1...). Ainsi, diverses stœchiométries d'association des sous-unités sont possibles pour chacun des sous-types de récepteurs concernés. Cela dépend de l'expression de chaque sous-unité dans une cellule donnée, qui peut évoluer selon le stade de développement de la cellule mais aussi en réponse à l'activité du réseau, de la stabilité des sous-unités dans le réticulum endoplasmique (RE), de l'affinité entre sous-unités, et potentiellement de leur diffusion dans la membrane du réticulum endoplasmique (Herguedas et al., 2013).

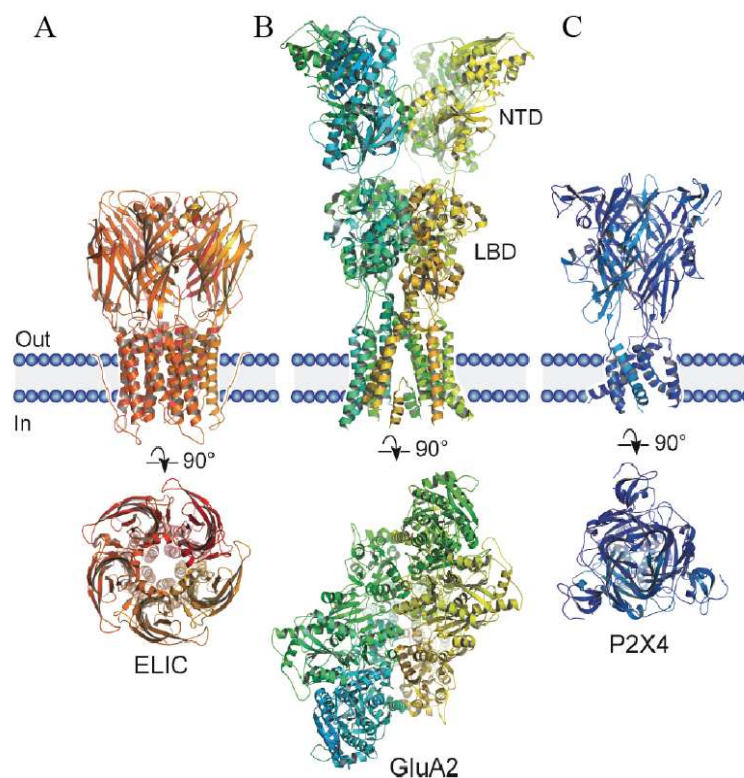


Figure 1.1. Les récepteurs-canaux s'assemblent en multimères. Vues perpendiculaires au plan de la membrane et vues synaptiques des structures cristallographiques de (A) un récepteur pentamérique, ELIC (bactérie, pdb 2VL0, 3.3 Å) ; (B) un iGluR tétramérique, AMPA GluA2 (rat, pdb 3KG2, 3.6 Å) ; (C) un récepteur P2X trimérique, P2X4 (poisson zèbre, pdb 3H9V, 3.1 Å). De Lemoine et al., 2012.

La caractérisation des états d'oligomérisation des récepteurs-canaux constitue un enjeu important. En effet, la composition et l'arrangement spatial des sous-unités dans un récepteur-canal déterminent en grande partie sa fonction (Chang et al., 2008). Établir cet arrangement permet de définir de nouvelles interfaces, de préciser le rôle particulier de chaque sous-unité et d'apporter ainsi de nouvelles informations concernant les mécanismes d'activation du récepteur et l'action d'agents pharmacologiques.

1.1.2. Arrangement des sous-unités dans un récepteur AMPA

La nature tétramérique des iGluRs a été révélée par diverses approches, électrophysiologiques, biochimiques et biophysiques (Rosenmund et al., 1998 ; Shanks et al., 2010 ; Greger et al., 2003 ; Matsuda et al., 2005). Les premières images d'un récepteur iGluR entier ont été obtenues par microscopie électronique (ME) de particules uniques à partir de rAMPA recombinants et natifs (Nakagawa et al., 2005; Tichelaar et al., 2004). Malgré leur faible résolution (30 Å), ces images ME mettent en évidence des caractéristiques structurales essentielles, telles que la symétrie d'ordre deux qui régit l'organisation du récepteur. Une avancée majeure dans l'étude de ces récepteurs, dont on ne connaissait, jusqu'à présent, que la structure des domaines isolés, a été la publication, en 2009, de la structure cristallographique d'un rAMPA-GluA2 homotétramérique entier (Sobolevsky et al., 2009 ; Fig. 1.2). Résolue par diffraction aux rayons X (3.6 Å), cette structure ne permet pas de déterminer l'orientation précise des chaînes latérales. Cependant, un affinement de la structure est possible grâce au remplacement moléculaire. Cette méthode consiste à placer les structures des NTDs et ABDs isolés dans la maille du cristal du rAMPA (molécule cible) puis, par des calculs de diffractions théoriques, en déduire, in fine, les coordonnées cartésiennes de chaque atome de la molécule.

La structure de ce rAMPA-GluA2 met en évidence un complexe tétramérique massif dans lequel les trois domaines majeurs (voir introduction 2.2.6.2.) s'arrangent en trois couches distinctes (Fig. 1.2) : celle des domaines transmembranaires (TMDs), formant le canal ionique, la couche des domaines N-terminaux (NTDs), avec ses quatre domaines individuels,

et entre les deux, les domaines de liaison des agonistes (ABDs). En adéquation avec les structures de domaines isolés, les domaines extra-cellulaires, NTDs d'une part et ABDs d'autre part, forment deux paires de dimères, arrangées selon une symétrie d'ordre deux. A contrario, la région transmembranaire s'organise selon une symétrie d'ordre quatre, typique des canaux potassiques. Une conséquence majeure de cette rupture de symétrie entre domaines extracellulaires et membranaires est l'existence, dans un rAMPA homomérique, de deux paires de sous-unités, chimiquement identiques mais de conformations distinctes. Selon les paires de sous-unités (A/C ou B/D dans la structure du rAMPA, Fig. 1.2) les "linkers" entre ABDs et TMDs devront adopter des conformations différentes, afin de s'adapter à cette rupture de symétrie. Cette non-équivalence entre sous-unités est sans précédent dans l'histoire des récepteurs-canaux. Elle est d'autant plus critique pour les iGluRs hétéromériques, majoritaires dans les tissus natifs et composés d'au moins deux sous-unités chimiquement distinctes.

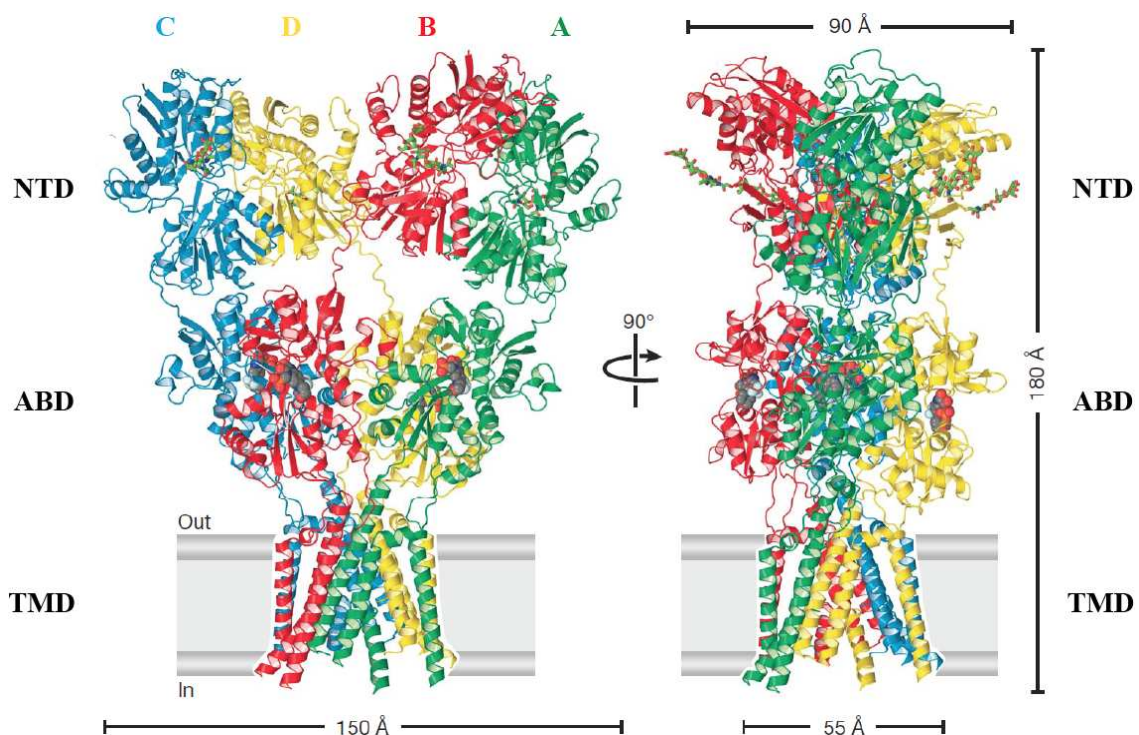


Figure 1.2. Structure cristallographique du rAMPA homotétramérique GluA2. Les quatre sous-unités GluA2, nommées de A à D, sont représentées respectivement en vert, rouge, bleu et jaune. Le récepteur entier s'organise selon trois couches, celles des TMDs, ABDs et NTDs. Il est représenté latéralement, dans un plan perpendiculaire à la membrane (gauche) et après rotation de 90° autour de l'axe de symétrie du récepteur (droite). D'après Sobolevsky et al., 2009.

Or la majorité des rAMPAs natifs sont des hétéromères organisés en dimères de dimères (Lu et al., 2009) associant une sous-unité GluA2 à une sous-unité GluA1, GluA3 ou GluA4 (Greger et al., 2007 ; Mayer, 2005). En 2001, Mansour et al ont démontré que dans un rAMPA GluA1/GluA2, les sous-unités s'arrangeaient de manière « alternée », c'est-à-dire avec des sous-unités identiques positionnées diagonalement autour du pore (Mansour et al., 2001). Récemment, Balasuriya et al. (2013) ont validé cet arrangement des sous-unités GluA1 et GluA2 dans un rAMPA hétéromérique, par microscopie à force atomique (AFM ; Balasuriya et al., 2013). Il reste désormais à déterminer si cette organisation est généralisable à l'ensemble des rAMPAs hétérotétramériques et à définir la conformation précise de chaque paire de sous-unités (GluA2 de type A/C et GluA1 de type B/D ou inversement).

1.1.3. Le cas des récepteurs NMDA : un arrangement débattu

La situation des rNMDAs est complexe car, contrairement aux rAMPAs et certains rKAs, ils s'assemblent obligatoirement en hétéromères, associant le plus souvent deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 (Paoletti, 2011 ; Paoletti et al., 2013 ; Traynelis et al., 2010 ; Monyer et al., 1992 ; Schorge & Colquhoun, 2003 ; Ulbrich & Isaacoff, 2008). Plus précisément, il a été démontré que les rNMDAs s'organisaient en dimère de dimères (Mayer, 2011), l'unité fonctionnelle pouvant être l'homodimère (GluN1/GluN1 ou GluN2/GluN2) ou l'hétérodimère (GluN1/GluN2). En 2003, un homodimère d'ABDs GluN1 est cristallisé par Furukawa et al., dans des conditions de surexpression de la sous-unité GluN1. Peu après, la même équipe publie la structure cristallographique d'un hétérodimère d'ABDs GluN1/GluN2A, structure étayée de résultats biochimiques (pontage disulfure) et fonctionnels (électrophysiologie) en accord avec l'hétérodimérisation des ABDs de GluN1 et GluN2 dans un récepteur complet (Furukawa et al., 2005). Quelques années plus tard, de nouvelles études électrophysiologiques (Gielen et al., 2008 ; Borschel et al., 2011) confirment que l'unité fonctionnelle d'un rNMDA, au niveau de la couche des ABDs, est un hétérodimère GluN1/GluN2.

Dès lors se pose la question de l'arrangement de ces deux hétérodimères pour former un complexe tétramérique. En effet, ils peuvent être disposés l'un à côté de l'autre, avec les

sous-unités identiques qui seraient adjacentes (arrangement dit « non-alterné » ou de type 1-1-2-2 ; Fig. 1.3.A). Les sous-unités identiques peuvent également être diamétralement opposées (l'arrangement est alors dit « alterné » ou de type 1-2-1-2 ; Fig. 1.3.B).

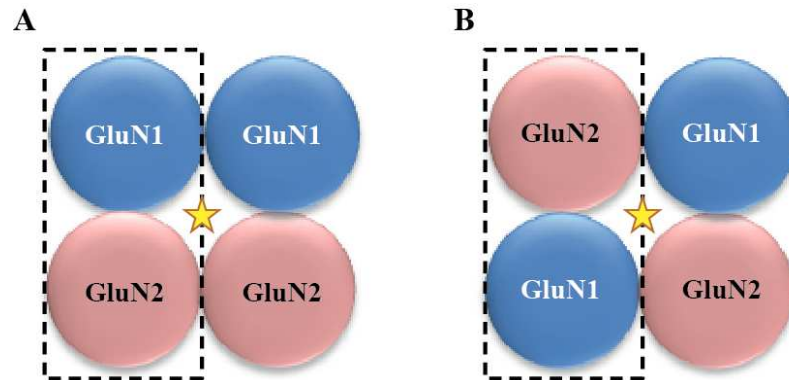


Figure 1.3. Les deux hétérodimères GluN1/GluN2 d'un récepteur NMDA peuvent s'agencer de deux manières. L'arrangement des sous-unités autour du pore peut être (A) de type non-alterné, ou 1-1-2-2, ou (B) de type alterné, ou 1-2-1-2. L'hétérodimère fonctionnel est entouré en pointillé. L'interface de tétramérisation entre deux dimères est représentée par une étoile.

En 2003, S.Schorge et D.Colquhoun ont étudié l'expression fonctionnelle de différents tandems et paires de tandems de sous-unités GluN1 et GluN2A afin de déterminer la stoechiométrie et l'arrangement des sous-unités d'un rNMDA. Leur étude s'appuie sur la mesure de courants portés par des récepteurs recombinants exprimés dans des cellules HEK. Ces récepteurs sont en fait composés de deux tandems de sous-unités GluN1 et/ou GluN2A. Un tandem est constitué de deux sous-unités "ligaturées" : deux GluN1 ou deux GluN2A ensemble, ou encore une GluN1 et une GluN2A. Chaque tandem correspond donc à un dimère "forcé". Parmi les combinaisons de tandems testées, les auteurs n'ont retenu que celles formant des récepteurs fonctionnels et produisant des courants stables. Les plus aptes à produire des courants satisfaisants sont formés d'un tandem GluN1/GluN1 et d'un tandem GluN2A/GluN2A. Les auteurs en concluent que dans un rNMDA fonctionnel, les sous-unités sont disposées selon un arrangement non-alterné, GluN1/GluN1/GluN2A/GluN2A (Fig. 1.3.A). La principale contrainte de leur technique est de pouvoir relier "physiquement" les deux sous-unités pour former le tandem. Cet assemblage ne peut se faire qu'entre l'extrémité

C-terminale de l'une et N-terminale de l'autre. Cela pose problème pour les sous-unités du rNMDA car le CTD est intracellulaire et le NTD extracellulaire. Pour contourner ce problème, les auteurs ont ôté un des segments transmembranaires (le TM4) d'une des sous-unités GluN1 ou GluN2 afin que son CTD soit extracellulaire. Or les segments transmembranaires sont essentiels au "gating" du récepteur et également à son assemblage (voir Introduction **3.2**). Enlever un de ces segments transmembranaires est donc susceptible de perturber l'assemblage tétramérique, or l'arrangement des sous-unités dans le récepteur est précisément ce que les auteurs questionnent ici. Ainsi, par exemple, bien que ces récepteurs "tandem" soient porteurs de courant, leurs propriétés fonctionnelles (sensibilité aux agonistes notamment) sont significativement modifiées par rapport à un récepteur de type sauvage. D'ailleurs, les auteurs mentionnent la possibilité, pour une sous-unité contrainte dans un tandem, de fonctionner de manière indépendante (Liman et al., 1992; McCormack et al., 1992). C'est pourquoi, pour ajouter plus de crédit à leurs résultats, ils multiplient les essais sur différentes combinaisons de tandems. Cependant, leur hypothèse est corroborée deux ans plus tard par des analyses de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre des sous-unités "tagguées" d'un rNMDA (Qiu et al., 2005). Durant toutes ces années, l'arrangement 1-1-2-2 d'un rNMDA est donc resté le modèle dominant (Fig. **1.3.A**).

En 2009, la cristallisation du rAMPA-GluA2 entier (Fig. **1.2**) relance le débat. Dans la couche des ABDs d'un rAMPA, les sous-unités A et D d'une part et les sous-unités B et C d'autre part forment des dimères et l'interface de tétramérisation fait intervenir exclusivement les sous-unités A et C (Fig. **1.2**). Ces dernières sont désignées comme les sous-unités proximales (au niveau des ABDs), B et D étant les sous-unités distales. Ainsi, en raison de la rupture de symétrie qui est décrite dans le rAMPA-GluA2, et de la non-équivalence des quatre sous-unités, deux hétérodimères d'ABDs GluN1/GluN2 peuvent en fait s'arranger de trois manières différentes dans un rNMDA tétramérique (Fig. **1.4**) : avec les sous-unités GluN1 adjacentes (type non-alterné GluN1/GluN1/GluN2/GluN2 ou 1/1/2/2 ; Fig. **1.4.A**) ou diamétralement opposées (type alterné GluN1/GluN2/GluN1/GluN2 ou 1/2/1/2, avec les sous-unités GluN1 soit proximales (Fig. **1.4.B**) soit distales (Fig. **1.4.C**) par rapport à l'axe de symétrie des ABDs). Pour déterminer l'arrangement relatif des sous-unités GluN1 et GluN2 dans les rNMDAs, Sobolevsky et al. (2009) ont introduit des cystéines dans les ABDs de ces sous-unités aux positions homologues à celles correspondant à l'interface de tétramérisation du rAMPA (Fig. **1.4**). Grâce à des couplages par ponts disulfures entre sous-unités, ils

proposent que celles-ci s'arrangent de telle façon que ce soient les sous-unités GluN1 qui participent à la tétramérisation aux niveaux des ABDs (arrangement de type 1-2-1-2 ; Fig. **1.4.B**). En 2010, Rambhadran et al. apportent des arguments supplémentaires en faveur d'un arrangement alterné, grâce à des mesures de transfert d'énergie de fluorescence (LRET) entre les ABDs "taggués" d'un rNMDA GluN1/GluN2A. D'après les distances obtenues et en prenant la structure du rAMPA comme modèle, les auteurs suggèrent que, au niveau des ABDs, les sous-unités GluN1 sont les sous-unités proximales et les sous-unités GluN2, les sous-unités distales.

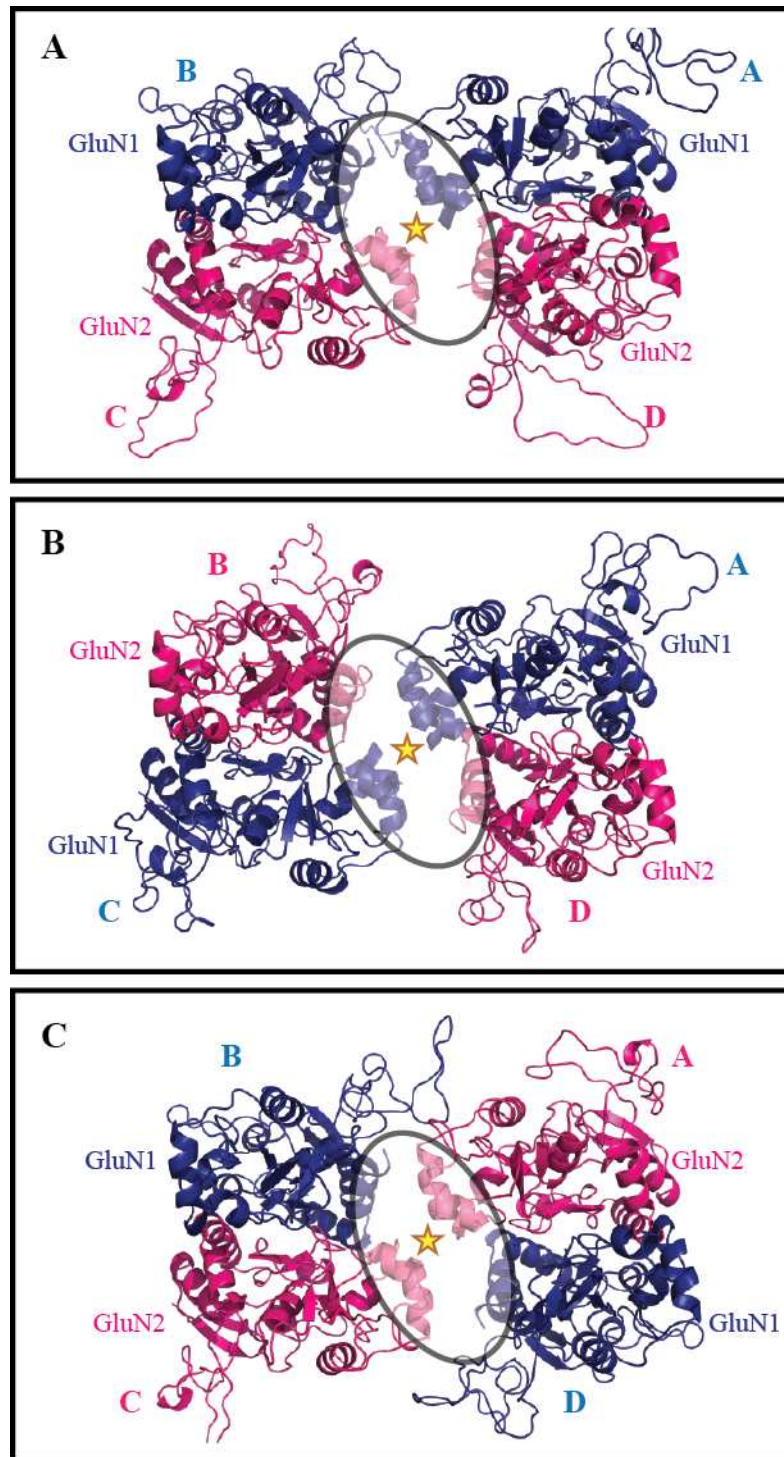


Figure 1.4. Trois possibilités d'arrangement relatif des sous-unités dans la couche des ABDs, à partir d'hétérodimères GluN1/GluN2A et du modèle rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009). Les trois modèles ont été réalisés par homologie avec la structure du rAMPA-GluA2 (pdg 3KG2). Les sous-unités GluN1 et GluN2A sont représentées en bleu et en rose respectivement. L'interface de tétramérisation est matérialisée par une étoile. Les ovales mettent en évidence les hélices impliquées dans la tétramérisation des ABDs.

L'arrangement spatial des sous-unités autour du pore, dans un rNMDA tétramérique demeure donc un sujet controversé. Ces dix dernières années, des résultats ont été publiés, soutenant aussi bien l'une des hypothèses (arrangement non-alterné ; Fig. **1.4.A**) que l'autre (arrangement alterné ; Fig. **1.4.B et C**). Mon objectif au cours de ce premier projet a donc été de clarifier cette caractéristique structurale essentielle à la bonne compréhension des mécanismes régissant le fonctionnement des rNMDAs.

1.1.4. Approche adoptée dans cette étude

Par une approche combinant électrophysiologie sur rNMDAs recombinants et biochimie de pontages disulfures, nous avons tenté de déterminer l'arrangement spatial des sous-unités autour du pore dans un rNMDA tétramérique fonctionnel exprimé dans les ovocytes de *Xénope*. Nous avons ciblé notre étude sur deux régions du récepteur pour lesquelles les paires de sous-unités A/C versus B/D présentent le plus de différences (Fig. **1.4**). Il s'agit du lobe supérieur des ABDs et des "linkers" M3-S2 reliant le troisième segment transmembranaire (M3) avec le lobe inférieur de l'ABD (S2). En insérant des cystéines à diverses positions de ces deux régions, et en étudiant la formation de ponts disulfures, nous avons ainsi pu sonder la proximité entre sous-unités. D'après nos modèles, seules les cystéines des sous-unités proximales (paire A/C) sont suffisamment proches pour ponter. Déterminer quelles sous-unités pouvaient interagir, nous a permis de déterminer lequel des trois modèles décrivait l'arrangement des sous-unités dans un rNMDA entier, fonctionnel et exprimé à la membrane plasmique.

1.2. Article 1

An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors

Morgane Riou^{1,2,3,&}, David Stroebel^{1,2,3,&}, Mickael Edwardson⁴, Pierre Paoletti^{1,2,3,*}

1. Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, France
2. Inserm, U1024, Paris, France
3. CNRS, UMR 8197, Paris, France
4. Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

& equally contributing authors

* corresponding author : pierre.paoletti@ens.fr



An Alternating GluN1-2-1-2 Subunit Arrangement in Mature NMDA Receptors

Morgane Riou^{1,2,3}, David Stroebel^{1,2,3}, J. Michael Edwardson⁴, Pierre Paoletti^{1,2,3*}

1 Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, France, **2** Inserm, U1024, Paris, France, **3** CNRS, UMR 8197, Paris, France, **4** Department of Pharmacology, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom

Abstract

NMDA receptors (NMDARs) form glutamate-gated ion channels that play a critical role in CNS physiology and pathology. Together with AMPA and kainate receptors, NMDARs are known to operate as tetrameric complexes with four membrane-embedded subunits associating to form a single central ion-conducting pore. While AMPA and some kainate receptors can function as homomers, NMDARs are obligatory heteromers composed of homologous but distinct subunits, most usually of the GluN1 and GluN2 types. A fundamental structural feature of NMDARs, that of the subunit arrangement around the ion pore, is still controversial. Thus, in a typical NMDAR associating two GluN1 and two GluN2 subunits, there is evidence for both alternating 1/2/1/2 and non-alternating 1/1/2/2 arrangements. Here, using a combination of electrophysiological and cross-linking experiments, we provide evidence that functional GluN1/GluN2A receptors adopt the 1/2/1/2 arrangement in which like subunits are diagonal to one another. Moreover, based on the recent crystal structure of an AMPA receptor, we show that in the agonist-binding and pore regions, the GluN1 subunits occupy a “proximal” position, closer to the central axis of the channel pore than that of GluN2 subunits. Finally, results obtained with reducing agents that differ in their membrane permeability indicate that immature (intracellular) and functional (plasma-membrane inserted) pools of NMDARs can adopt different subunit arrangements, thus stressing the importance of discriminating between the two receptor pools in assembly studies. Elucidating the quaternary arrangement of NMDARs helps to define the interface between the subunits and to understand the mechanism and pharmacology of these key signaling receptors.

Citation: Riou M, Stroebel D, Edwardson JM, Paoletti P (2012) An Alternating GluN1-2-1-2 Subunit Arrangement in Mature NMDA Receptors. PLoS ONE 7(4): e35134. doi:10.1371/journal.pone.0035134

Editor: Laurent Groc, Institute for Interdisciplinary Neuroscience, France

Received: February 4, 2012; **Accepted:** March 13, 2012; **Published:** April 6, 2012

Copyright: © 2012 Riou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work supported by Wellcome Trust, Central National de la Recherche Scientifique (CNRS), Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM, Equipe FRM), and Direction Générale de l'Armement. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: pierre.paoletti@ens.fr

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Ionotropic glutamate receptors (iGluRs) mediate most excitatory neurotransmission in the vertebrate brain and function by opening a transmembrane ion channel upon binding of glutamate. The iGluRs are critical for normal brain function and development, and their dysfunction is implicated in numerous neurological and psychiatric disorders [1]. Based on sequence homology and pharmacology, iGluRs can be grouped into three main subfamilies: AMPA-, kainate- and NMDA-type, the latter being unique in its ability to flux calcium and trigger synaptic plasticity mechanisms [1]. Since the cloning of iGluR subunits some twenty years ago, a wealth of information regarding iGluR structure and mechanism of operation has been obtained [2,3]. Unlike other ionotropic neurotransmitter receptors that form either pentamers (Cys-loop receptors) or trimers (P2X receptors), the iGluRs assemble as tetrameric complexes composed of four homologous pore-forming subunits. All iGluR subunits share a unique modular architecture consisting of a large extracellular N-terminal domain (NTD) that participates in subtype-specific assembly and modulation; an agonist-binding domain (ABD also known as S1S2) that binds glutamate (or glycine/D-serine in certain NMDAR subunits); a transmembrane domain (TMD)

comprising three membrane spanning segments (M1, M3 and M4) plus a short re-entrant loop (M2) lining the ion selectivity filter; and a cytoplasmic C-terminal domain (CTD), variable in length and involved in receptor trafficking, localization and regulation.

A major breakthrough in the field was recently achieved with the crystal structure of a homomeric GluA2 AMPAR [4] thus providing the first atomic map of an intact iGluR. The structure revealed a massive Y-shaped structure in which the three major domains are arranged in layers: at the narrow “base”, the TMDs, at the “top” the NTDs and sandwiched in between these two layers the ABDs. As anticipated from studies on isolated domains [3], the extracellular NTD and ABD both assemble in the full length structure as dimers of dimers but with surprisingly few contacts between the four constitutive dimers. The pore region, in contrast, adopts a more compact structure with the typical four-fold symmetrical architecture found in potassium channels. Accompanying the two-fold to four-fold symmetry transition between the extracellular and pore regions, another key feature revealed by the GluA2 structure is domain swapping. Thus, local dimer assemblies in the NTD and ABD layers engage different subunit pairs. As a consequence of domain swapping and symmetry mismatch, the four chemically-identical GluA2 subunits adopt two pairs of conformationally distinct subunits, A/C and B/

D (Fig. 1; [4]), with like conformers diagonal to one another. At the NTD layer, the A/C subunits are more “distal” from the central axis of the pore than the B/D subunits, while at the ABD layer, the A/C subunits occupy a more “proximal” position and participate in a tetrameric (dimer-of-dimers) interface (Fig. 1). Such an asymmetrical organization is without precedent in other families of neurotransmitter receptors.

NMDARs and kainate receptors are likely to adopt a general arrangement similar to that of AMPARs [1,5]. However, unlike AMPA and kainate receptors that can function as homomers, NMDARs are obligatory heteromers usually composed of two GluN1 and two GluN2 subunits of which there are four isoforms (GluN2A-D) [6]. Although the NTDs and ABDs are likely to arrange as local GluN1/GluN2 heterodimers [7,8,9,10,11], there have been diverging results regarding the subunit order around the pore, with data supporting a 1/2/1/2 [4,12,13] or 1/1/2/2 [14,15] organization. Here, by exploiting disulfide cross-linking to probe proximity relationships between subunits, we provide evidence that subunits in a functional GluN1/GluN2A receptor arrange in a 1/2/1/2 pattern with the GluN1 subunits adopting the “proximal” A/C conformation in the gating core region. Our results also highlight the fact that the existence of stable pools of intracellular GluN1 oligomers is a confounding factor in immunoblots studies of NMDARs.

Results

In the closed-state GluA2 structure, symmetry mismatch between the ABD and the TMD levels is mediated primarily by the short linkers connecting the two domains (S1-M1, M3-S2 and S2-M4 linkers; ref. [4]). In particular, the M3-S2 linkers adopt two strikingly different conformations with the linkers from the B/D subunits stretching away from the pore axis while the linkers from

the A/C subunits remain close and prolong the TM3 segment by one helical turn (Fig. 2A). Accordingly, a cysteine introduced in the C-terminal end of TM3 (GluA2-M629C) can participate to a disulfide bridge in the A/C subunits but is too far removed to cross-link in the B/D subunits [4]. To explore which of the GluN1 and/or GluN2 subunits display the A/C and B/D conformers in the ABD-TMD linker region of a GluN1/GluN2A receptor, we introduced cysteines in GluN1 and GluN2A subunits at positions homologous to GluA2-M619 (Fig. 2A) and tested for possible disulfide cross-linking using electrophysiological recordings of *Xenopus* oocytes. Current responses from GluN1-P660C/Glu2Awt or GluN1wt/GluN2A-F658C receptors, and their respective control (alanine) mutants, were first subjected to the reducing agent dithioerythritol (DTE). Compared to control mutants, no significant effect of DTE on cysteine mutants was detected, and the use of Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) as an alternative reducing agent confirmed this result (Fig. 2B). This lack of effect was surprising given that the GluN1-P660C mutation had previously shown to yield dimers on immunoblots [4,13], and that cross-linking right next to the channel gate region (the SYTANLAAF region; ref. [16]) should lock the channels in a closed state.

Oxidizing treatments using 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoate) (DTNB) to promote the formation of disulfide bonds also resulted in no significant effect on current amplitude. Intriguingly, however, the oxidizing complex Copper/Phenanthroline (Cu/Phen) selectively reduced currents carried by GluN1-P660C/GluN2Awt receptors but not by GluN1wt/GluN2A-F658C receptors (Fig. 2C). Because cysteines, through their sulfhydryl moiety, are commonly found in metal-binding sites [17], we wondered whether the effect of Cu/Phen on GluN1-P660C/GluN2Awt receptors could be accounted for direct copper inhibition rather than a redox effect. Incubating in copper alone

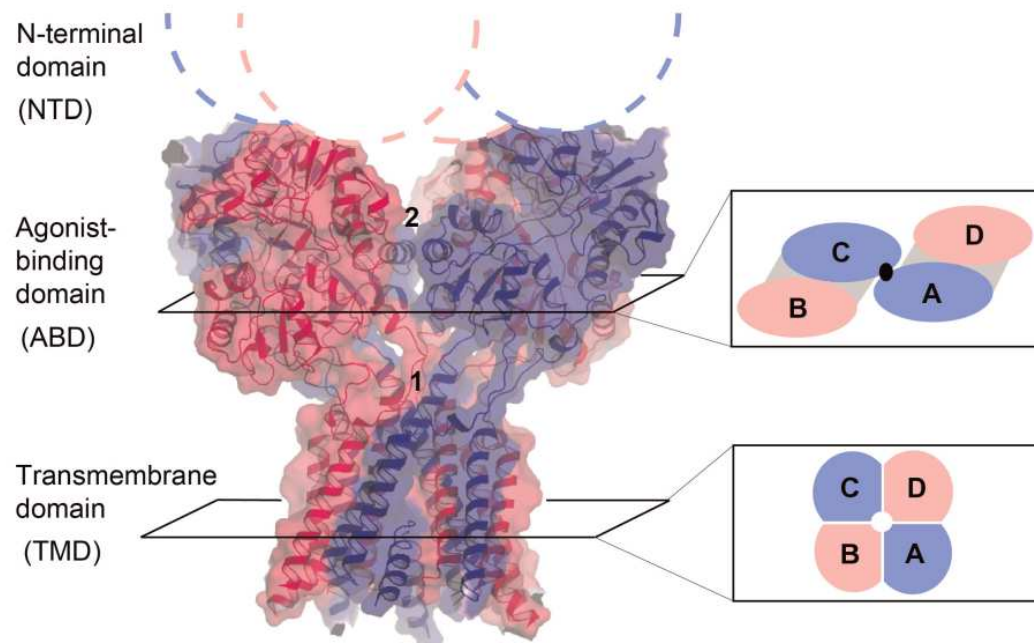


Figure 1. Subunit organization of the tetrameric GluA2 AMPA receptor. Side view of the gating core (ABD + TMD) of the GluA2 homotetramer [4]. The subunits adopt two different conformations, A/C (blue) and B/D (red). The insets on the right show how subunits are organized in the ABD and TMD (pore) layer. The grey shading indicates the two local ABD dimers. The black dot indicates the point of contact between subunits A and C at the dimer-of-dimers interface in the ABD layer. Numbers 1 and 2 highlight the two regions where mutations have been introduced in NMDARs.

doi:10.1371/journal.pone.0035134.g001

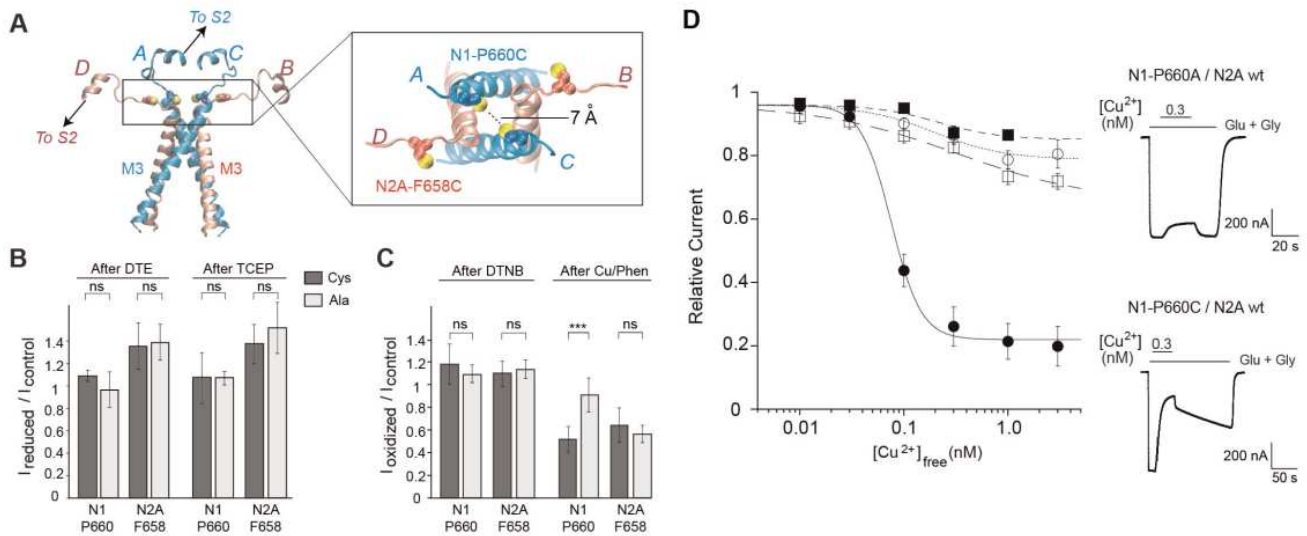


Figure 2. Insertion of a single cysteine in the GluN1 M3-S2 linker results in the creation of a high-affinity copper binding site. (A) The ion-channel (M3 and M3-S2 linkers) region of a modelled tetrameric GluN1/GluN2A receptor viewed from the side (left) and from above the membrane plane (right). In this alternating model (GluN1/2/1/2), the two GluN1 subunits (blue) are in the “proximal” A/C conformation and the two GluN2A subunits (red) in the “distal” B/D conformation. Homologous mutations GluN1-P660C and GluN2A-F658C are highlighted (sulphur in yellow). (B and C) Effects of reducing (B) and oxidizing (C) treatments on current amplitudes of the various cysteine (filled bars) or alanine (empty bars) mutant receptors. Values in B are (from left to right): 1.08 ± 0.05 ($n=8$), 0.96 ± 0.15 ($n=7$), 1.35 ± 0.2 ($n=14$), 1.38 ± 0.16 ($n=8$), 1.05 ± 0.22 ($n=9$), 1.05 ± 0.06 ($n=11$), 1.35 ± 0.16 ($n=20$), 1.49 ± 0.2 ($n=6$). Values in C are (from left to right): 1.18 ± 0.18 ($n=32$), 1.09 ± 0.08 ($n=8$), 1.1 ± 0.11 ($n=13$), 1.13 ± 0.08 ($n=4$), 0.51 ± 0.11 ($n=28$), 0.90 ± 0.15 ($n=19$), 0.65 ± 0.15 ($n=20$) and 0.56 ± 0.08 ($n=8$). (D) Copper inhibition dose-response curves for wild-type (open circles; $\text{Inhib}_{\text{max}} = 21\%$, $\text{IC}_{50} = 0.19$ nM, $n_{\text{H}} = 1.3$), GluN1wt/GluN2A-F658C (open squares; $\text{Inhib}_{\text{max}} = 34\%$, $\text{IC}_{50} = 0.33$ nM, $n_{\text{H}} = 0.7$), GluN1-P660C/GluN2Awt (filled circles; $\text{Inhib}_{\text{max}} = 78\%$, $\text{IC}_{50} = 0.075$ nM, $n_{\text{H}} = 3$) and GluN1-P660A/GluN2Awt receptors (filled squares; $\text{Inhib}_{\text{max}} = 15\%$, $\text{IC}_{50} = 0.21$ nM, $n_{\text{H}} = 1.5$). Right: current traces illustrating the inhibition of GluN1-P660A/GluN2Awt (top) and GluN1-P660C/GluN2Awt (bottom) receptors by 0.3 nM free copper. *** corresponds to $P < 0.001$; ns, non-significant; Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0035134.g002

produced similar inhibitions of GluN1-P660C/GluN2Awt currents than with Cu/Phen, and full dose-response curves with tricine-buffered copper solutions revealed the presence of a very high-affinity (subnanomolar) copper binding site in receptors containing the GluN1-P660C subunits (but not the GluN1-P660A subunits or GluN1wt) and the mutated GluN2A-F658C subunits (Fig. 2D). Thus, in functional receptors, the two cysteines introduced at position GluN1-P660 do not disulfide bridge as previously suggested [4,13] but have their thiol groups in close enough vicinity to participate in a copper coordinating site. Altogether these results strongly favor a model in which, in the ABD-TMD linker region, the two GluN1 subunits occupy the proximal A/C positions while the GluN2 subunits occupy the more distal B/D position. Incidentally, we suggest that the reversion of the Cu/Phen effects on certain GluN1 cysteine pore mutants observed by Salussolia et al. [13] upon application of DTT may result from copper chelation rather than from a *bona fide* redox effect (see ref. [18] for the metal chelating properties of DTT).

We next introduced cysteines in the ABD layer to map contact points between neighboring subunits. Guided by the superposition of the GluN1/GluN2A ABD heterodimer onto the GluA2 structure (Fig. 3A), we focused on several residues in helices E and G of GluN1 and GluN2A subunits that could potentially participate in a dimer-of-dimers interface. At the level of this interdimer interface, three types of contacts can be envisioned according to the different possible arrangements of the two heterodimers in the tetrameric assembly: heterophilic GluN1-GluN2 contacts or homophilic GluN1-GluN1 or GluN2-GluN2 contacts (Fig 3A and see ref. [4]). To check for potential functional effects of cysteine introduction in the ABD region, we assessed the

channel activity of mutated receptors by measuring the inhibition kinetics produced by the open-channel blocker MK-801 [19]. Of the several cysteine substitutions that were investigated, only GluN1-E698C/GluN2Awt mutant receptors showed a markedly altered (decreased) channel activity, as revealed by the 1.85-fold increase in MK-801 inhibition time constant compared with wild-type receptors (Fig. 3B). No such effect was observed with the control GluN1-E698A mutation (Fig. 3C). Moreover, channel activity could be further diminished (i.e. MK-801 inhibition time constant increased) by applying an oxidizing treatment, while a subsequent reducing treatment led to a strong increase in channel activity to a value close to that of untreated GluN1-E698A/GluN2Awt receptors (Fig. 3C). Thus, introduction of a single cysteine in the GluN1 subunit at position E698 is sufficient to result in disulfide bond formation. We also evaluated the effects of redox treatments on the activity of GluN1wt/GluN2A-Q671C receptors. In contrast to the effects previously described with the GluN1 mutant receptor, no effect specific to the GluN2A cysteine mutant was detected (Fig. 3C). These results indicate that within the ABD layer of functional GluN1/GluN2A receptors, residues from the GluN1 subunit ABD S2 region, but not the homologous region of the GluN2A subunit, participate in an interdimer interface. Thus, in a tetrameric GluN1/GluN2A assembly, the GluN1 subunits likely adopt the proximal A/C conformer at the ABD level, while the GluN2A subunits would adopt the more distal B/D configuration.

We obtained additional functional evidence that residue GluN1-E698 is involved in subunit-subunit contacts by reacting reduced (TCEP-treated) GluN1-E698C/GluN2Awt receptors with the thiol-specific modifying reagent MTSET. MTSET induced a marked and irreversible inhibition of currents from the cysteine

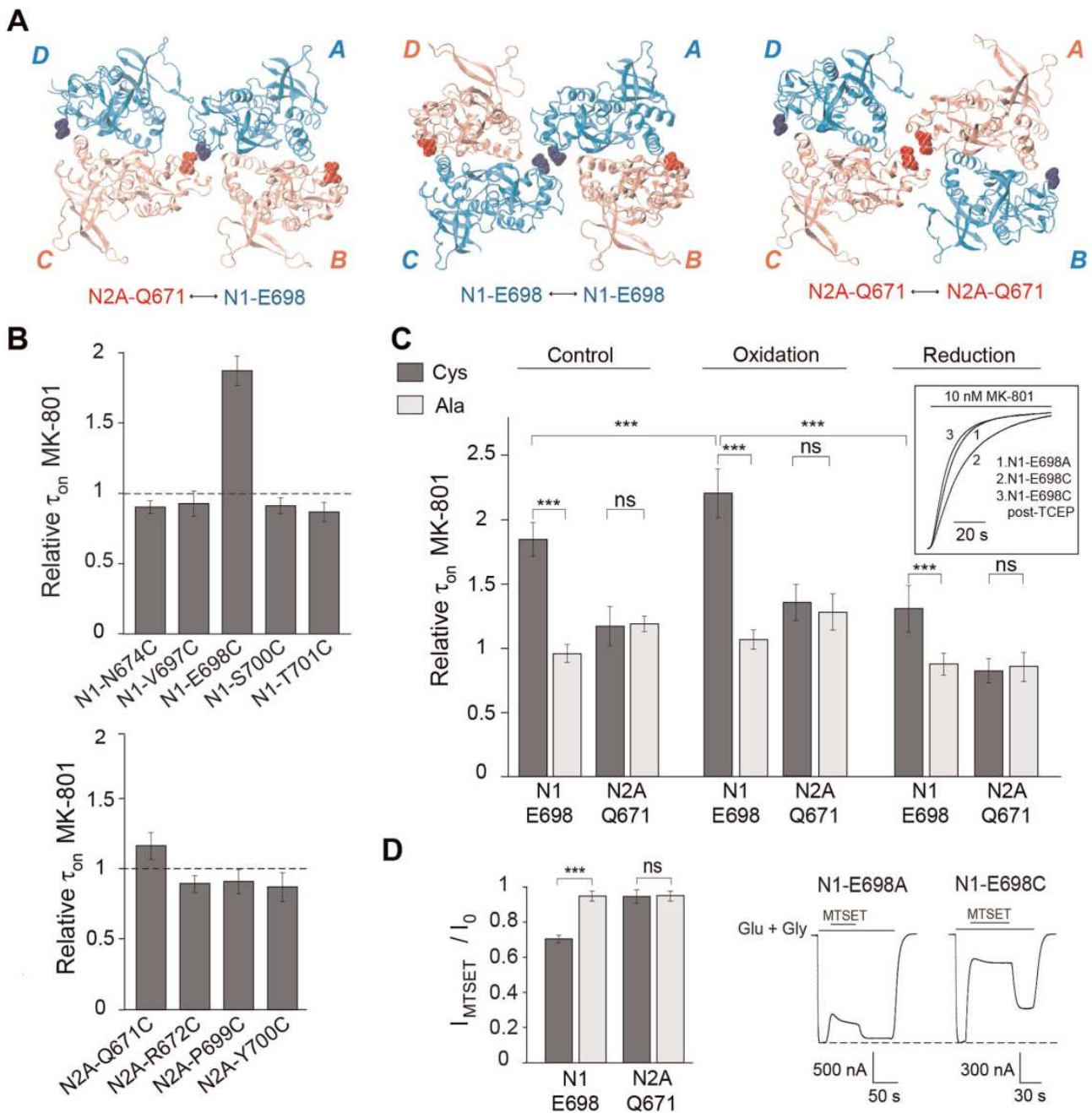


Figure 3. Disulfide cross-linking at the putative ABD dimer-of-dimers interface between GluN1, but not GluN2A, subunits. (A) Three possible arrangements viewed from the membrane region of GluN1/GluN2A ABD heterodimers in a NMDAR based on GluA2 structure. Mutated residues GluN1-E698 and GluN2A-Q671 are highlighted in blue and red, respectively. The residues either lie at the dimer-of-dimers interface in the proximal A/C subunits or protrude towards the exterior surface of the receptor in the distal B/D subunits. (B) MK-801 inhibition kinetics for various GluN1 (top) and GluN2A (bottom) mutants. Values are (from left to right): 0.9 ± 0.04 (n=5), 0.93 ± 0.09 (n=9), 1.85 ± 0.13 (n=20), 0.91 ± 0.05 (n=8), and 0.87 ± 0.06 (n=7) for GluN1 mutants; 1.17 ± 0.15 (n=21), 0.90 ± 0.06 (n=11), 0.91 ± 0.09 (n=11) and 0.87 ± 0.1 (n=11) for GluN2A mutants. All GluN1 mutant subunits were co-injected with GluN2A wt and all GluN2A mutant subunits with GluN1 wt. (C) Effects of redox treatments on the MK-801 inhibition kinetics for cysteine (filled bars) or alanine (empty bars) mutants. Values are (from left to right): control conditions, 1.85 ± 0.13 (n=20), 0.96 ± 0.07 (n=12), 1.17 ± 0.15 (n=21), 1.19 ± 0.06 (n=9); after incubation with Cu/Phen (oxidation): 2.21 ± 0.18 (n=12), 1.07 ± 0.07 (n=10), 1.28 ± 0.14 (n=18), 1.36 ± 0.14 (n=9); after subsequent incubation with TCEP (reduction): 1.31 ± 0.18 (n=19), 0.88 ± 0.08 (n=7), 0.83 ± 0.09 (n=17), 0.86 ± 0.11 (n=9). Inset: MK-801 inhibition kinetics are slower in non-treated GluN1-E698C/GluN2Awt receptors (2) than in non-treated GluN1-E698A/GluN2Awt receptors (1) or TCEP-treated GluN1-E698C/GluN2Awt receptors (3) (normalized currents). (D) Effects of MTSET application on current amplitudes for cysteine (filled bars) or alanine (empty bars) mutants. Values are (from left to right): 0.70 ± 0.02 (n=18), 0.95 ± 0.03 (n=11), 0.95 ± 0.04 (n=9) and 0.95 ± 0.02 (n=5). Right: current traces illustrating the effects of MTSET on GluN1-E698A/GluN2Awt and GluN1-E698C/GluN2Awt receptors. *** corresponds to $P < 0.001$; ns, non-significant; Student's *t*-test. doi:10.1371/journal.pone.0035134.g003

mutant receptors, while the non-reactive alanine mutant receptors were barely affected. In contrast, no specific effect of MTSET was observed on GluN1wt/GluN2A-Q671C receptors (Fig. 3D).

We next turned to immunoblot experiments to directly assess cysteine disulfide cross-linking and intersubunit dimer formation. We first analyzed mutant receptors composed of wt GluN1 subunits and GluN2A subunits with a cysteine introduced either in the TM3-S2 linker region or the ABD region. Under non-reducing conditions, no formation of high-molecular weight bands was detected for any of the mutant receptors (Fig. 4A). This result indicates that the introduced cysteines in the GluN2A subunit do not participate in intersubunit disulfide bond formation, in good agreement with the results of the functional experiments using electrophysiology. In contrast, high-molecular weight bands were clearly detected with receptors harboring a single cysteine substitution either in the TM3-S2 or ABD region of the GluN1 subunit. These bands were attributed to disulfide cross-linked GluN1 homodimers since they ran at the expected size (~220 kDa) and were absent in the control alanine mutants or in blots performed in reducing conditions (+DTE) (Fig. 4C).

The observation that GluN1-P660C mutant could form homodimers, while confirming previously published results [4,13], was clearly at odds with our electrophysiological experiments, which indicate that in functional GluN1-P660C mutant the introduced cysteines form a metal binding site and not a disulfide bridge (see Fig. 2). Our 3D model also indicated that the two

engineered cysteines are separated by too great a distance (7 Å S-S, 12 Å C α -C α ; Fig. 2A) to cross-link [20,21]. Because in electrophysiological experiments, only fully-mature plasma-membrane embedded receptors are monitored, we wondered whether the GluN1-P660C homodimers observed in immunoblots could be attributed to intracellular pools of cross-linked GluN1 subunits. It is well established that the GluN1 subunit, both in recombinant and native systems, can form stable intracellular homo-oligomers while GluN2 subunits do not [22,23,24,25]. To try to discriminate between intracellular receptors from those expressed at the cell surface, we compared immunoblots from cells treated either with DTE or TCEP. Both compounds are powerful reducing agents but while DTE can cross biological membranes, TCEP is membrane-impermeant [26] (Fig. 4B). As shown in Figure 4C, the GluN1-P660C homodimer band was sensitive to DTE but not to TCEP, suggesting that the GluN1-P660C homodimers are for the most part localized intracellularly. The situation differed strikingly with the cysteine introduced in the GluN1 ABD at the putative interdimer interface (GluN1-E698C/GluN2Awt receptors). There, the GluN1-E698C homodimer band was sensitive to both DTE and TCEP (Fig. 4C). These results suggest that a sizeable fraction of GluN1-E698C/GluN2A receptors with disulfide cross-linked GluN1 subunits are expressed at the plasma membrane. These results are in good agreement with our previous observations

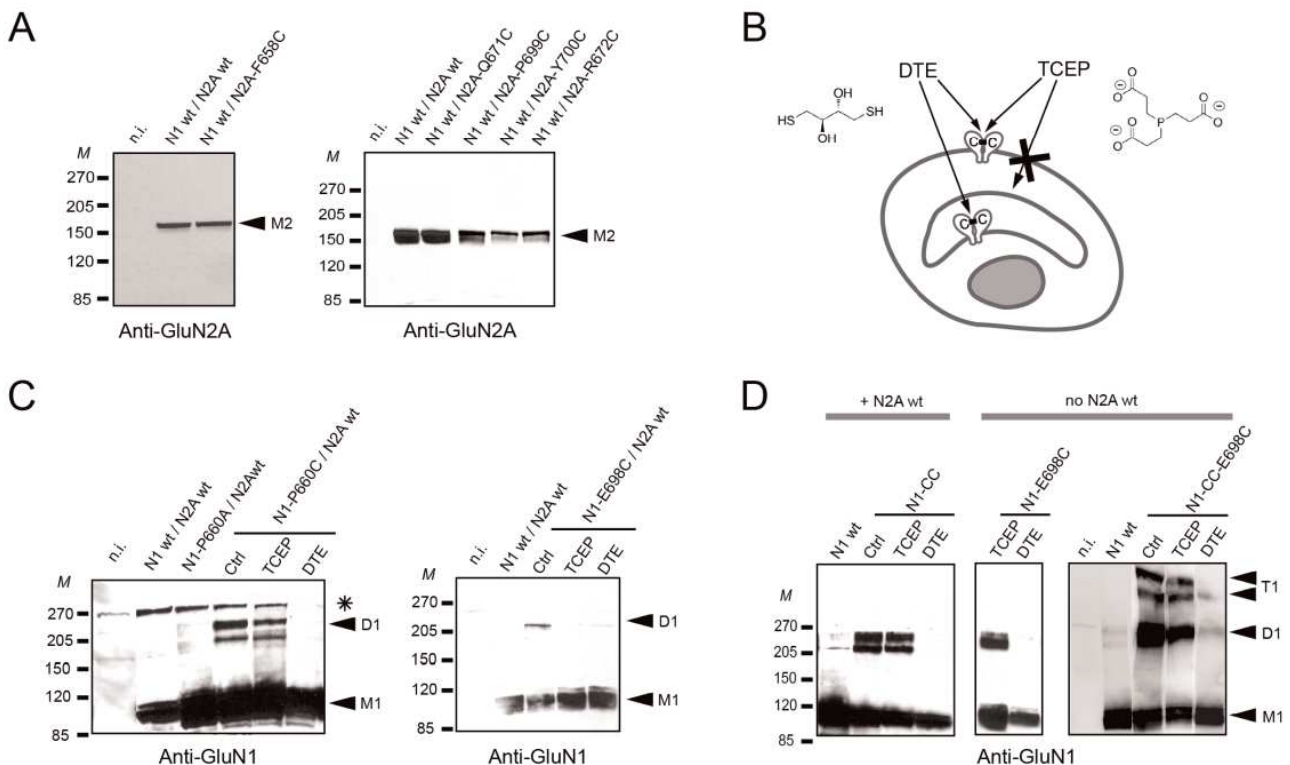


Figure 4. Intracellular and plasma-membrane pools of disulfide cross-linked receptors. (A) Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wt or GluN2A mutant receptors. (B) Schematic representation of a cell expressing intracellular and plasma-membrane pools of receptors with intersubunit disulfide cross-links. Because of their differential membrane permeability, the reducing agent DTE acts on both pools while the reducing agent TCEP acts solely on the cell surface pool. (C) Immunoblots from oocytes expressing either wt or GluN1 mutant receptors. (D) Immunoblots from oocytes injected either with both GluN1 and GluN2A subunits or with the GluN1 subunit alone. M1 indicates the expected band position of the GluN1 monomer (~110 kDa); M2, the GluN2A subunit (~220 kDa); D1, the GluN1 homodimer (~220 kDa) and T1 the approximate location of the GluN1 homo-trimer and/or homo-tetramer (>300 kDa). CC stands for mutations GluN1-N521C-L777C (in ABD intradimer interface). M stands for molecular weight marker and n.i. for non-injected oocytes. * indicates non-specific bands seen with the anti-GluN1 antibody. doi:10.1371/journal.pone.0035134.g004

that currents carried by GluN1-E698C/GluN2Awt receptors are redox sensitive (see Fig. 3).

We obtained additional evidence for the validity of our DTE/TCEP approach by expressing mutated GluN1 subunits alone, without a co-expressed GluN2 subunit. In this condition, the vast majority of the GluN1 subunits are known not to traffic to the plasma membrane but instead remain “stuck” in intracellular pools [22,23,24]. As anticipated, immunoblots of oocytes expressing the GluN1-E698C subunit alone revealed a GluN1 homodimer band sensitive to DTE but not to TCEP (Fig. 4D). When we combined the E698C mutation with two additional cysteine mutations within the ABD intradimer interface (mutations GluN1-N521C-L777C; refs. [7,8,27]), bands of very high molecular weight were observed in addition to the homodimer band. Again these bands were sensitive to DTE but not to TCEP (Fig. 4D). Thus, the triple cysteine GluN1 mutant subunit can accumulate as intracellular pools of homotrimers or homotetramers with disulfide cross-links within and between GluN1 ABD dimers. Noticeably, when the double mutant GluN1-N521C-L777C subunit was co-expressed with the wt GluN2A subunit, DTE-sensitive, but TCEP-insensitive, GluN1 homodimer bands were observed (Fig. 4D). These bands most likely correspond to intracellular stocks of GluN1 homodimers with the two GluN1 ABDs cross-linked at the intradimer interface. Such assemblies are not present in functional receptors. In these latter, the ABDs arrange as local GluN1/GluN2 heterodimers [7,8].

Discussion

In the present work we provide biochemical and functional evidence that mature GluN1/GluN2A NMDARs adopt an alternating GluN1/2/1/2 subunit arrangement with the two GluN1 subunits occupying the “proximal” A/C conformation seen in the AMPAR GluA2 receptor and the two GluN2A subunits occupying the distinct B/D conformation. Our biochemical approach based on differential detection of disulfide cross-linked receptors between intracellular and cell surface receptor pools also reveals that the subunit arrangement can differ between functional (cell surface) and intracellularly-retained receptors. In particular, cysteine-engineered GluN1 subunits have a strong propensity to form oligomeric assemblies that are not found in mature receptors. Overall, our results buttress previous findings that NMDAR maturation involves rearrangement of subunit contacts [25].

The interpretation of our results strongly relies on the assumption that the general subunit arrangement of NMDARs resembles that described in the AMPAR GluA2 structure, at least in the gating core region (ABD + TMD). The overall sequence homology between iGluR subunits and the striking similarities in the structure and mechanism of the ABDs between all iGluRs [1] strongly argue that this likely to be the case. Our present finding that, based on the GluA2 structure, cysteines (GluN1-E698C) introduced at a putative ABD tetrameric interface can cross-link in a mature GluN1/GluN2A receptor and impact its function (Fig. 3A) provides additional evidence that NMDAR and AMPAR subunits arrange similarly. It also suggests that in a NMDAR the ABD tetrameric interface experiences conformational mobility during receptor gating. Our results reveal that this interface involves the GluN1, but not the GluN2, subunits. Moreover, as a consequence of symmetry mismatch between the ABD and TMD layers, the GluN1 subunits - and more generally the A/C conformers in an iGluR - are expected to couple differently to the ion channel gate than the GluN2 subunits (B/D conformers). As a matter of fact, differential contributions of

GluN1 and GluN2 subunits to NMDAR channel gating have been reported [28,29,30,31]. The knowledge of the spatial organization of the subunits within a functional NMDAR complex provides an essential structural framework to understand how the four subunits interact and co-operate during channel gating and modulation.

Materials and Methods

Molecular biology

The expression plasmids for the rat GluN1-1a subunit and the rat GluN2A subunit, the mutagenesis strategy and sequencing have been previously described [10,18]. All amino acid (aa) numbering is for full-length proteins (i.e. including the signal peptide). For correspondence with other studies not considering full-length proteins, a difference in the numbering of GluN1 and GluN2A subunits should be applied (for ref. [13], +18 and +19 aa, respectively; for ref. [4], -1 and +27 aa, respectively).

Electrophysiological experiments and data analysis

Recombinant NMDARs were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after nuclear co-injection of cDNAs (at 10-30 ng/ μ l) coding for the various GluN1-1a and GluN2A subunits (ratio 1:1). Oocytes were prepared, injected, voltage-clamped, and superfused as described previously [18]. The standard external solution contains (in mM): 100 NaCl, 0.3 BaCl₂, 2.5 KCl, 5 HEPES, and 0.01 DTPA (pH 7.3). The heavy metal chelator DTPA (diethylenetriamine-pentaacetic acid) was added to all solutions, except in copper-containing solutions, to prevent tonic inhibition of GluN1/GluN2A receptors by trace amounts of zinc [18]. NMDAR-mediated currents were induced by simultaneous application of saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100 μ M each). Recordings were performed at a holding potential of -60 mV and at room temperature. For copper dose-response experiments, copper was buffered using 10 mM tricine. For free copper concentrations of 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1 and 3 nM, total (added) concentrations of copper (CuSO₄ salt) were (in μ M): 2.3, 7.0, 23, 70, 210 and 550, respectively. These values were calculated using Geochem with stability constants of 10⁷ M and 10^{4.2} M for the equilibria Tricine + Cu²⁺ \rightleftharpoons Tricine-Cu²⁺ and Tricine-Cu²⁺ + Tricine \rightleftharpoons Tricine₂-Cu²⁺, respectively [32]. For the highest concentrations of free copper (1 and 3 nM), pH was readjusted to 7.3. Experiments using MK-801 (10 nM) and ([2-(Trimethylammonium)ethyl]methane-thiosulfonate bromide) (MTSET, 200 μ M) were performed as described in ref. [10].

Data were collected and analyzed using Clampex 7.0 and Clampfit 9.2 (Axon Instruments), respectively. For copper dose-response curves, data points were fitted in Kaleidagraph 4.0 (Synergy Software) using the following Hill equation: $I_{Cu}/I_{control} = 0.96 \cdot \text{Inhib}_{max} / (1 + (IC_{50}/[Cu^{2+}]^{n_H})^2)$, where $I_{Cu}/I_{control}$ is the mean relative current, $[Cu^{2+}]$ the concentration of free copper, n_H the Hill coefficient and $(\text{Inhib}_{max} + 0.04)$ the maximal copper inhibition. IC_{50} , Inhib_{max} and n_H were set as free parameters. Error bars represent the standard deviation of the mean value.

Redox treatments

Oocytes were incubated at room temperature with either dithioerythritol (DTE, 5 mM, 15 min), tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, 5 mM, 15 min), 5,5'-dithio-bis-(2-nitro-benzoic acid) (DTNB, 0.5 mM, 5 min), or copper(II):phenanthroline (Cu/Phen, 10:30 μ M, 12 min), all prepared in a Barth solution supplemented with gentamycin (50 μ g/ml) and D-AP5 (50 μ M) [8]. For DTE and TCEP solutions, pH was adjusted to 8.0. The DTNB solution was also supplemented with DTPA (10 μ M).

Immunoblotting

Sample preparation, non-reducing SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described in ref. [10]. The following antibodies were used: anti-GluN1 antibody (1:1000, mouse monoclonal MAB363 clone 54.1; Millipore), anti-GluN2A antibody (1:500, rabbit monoclonal A12W; Millipore), secondary goat peroxidase-conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibody (1:20,000, Jackson ImmunoResearch). Non-specific bands (i.e. bands detected in immunoblot experiments with non-injected oocytes), were regularly observed with the anti-GluN1 antibody. The intensity of these bands varies from one batch of oocytes to another. The molecular weight of the main non-specific band is ~270 kDa.

Homology modeling

3D homology modeling was performed using the program Modeller and structure illustrations were prepared using PyMol

References

1. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, et al. (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 405–496.
2. Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440: 456–462.
3. Mayer ML (2011) Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function. *Structure* 19: 1370–1380.
4. Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462: 745–756.
5. Das U, Kumar J, Mayer ML, Plested AJ (2010) Domain organization and function in GluK2 subtype kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8463–8468.
6. Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33: 1351–1365.
7. Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438: 185–192.
8. Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, et al. (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57: 80–93.
9. Lee CH, Gouaux E (2011) Amino terminal domains of the NMDA receptor are organized as local heterodimers. *PLoS One* 6: e19180.
10. Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30: 3134–3146.
11. Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475: 249–253.
12. Rambhadrans A, Gonzalez J, Jayaraman V (2010) Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J Biol Chem* 285: 15296–15301.
13. Salussolia CL, Prodromou ML, Borker P, Wollmuth LP (2011) Arrangement of subunits in functional NMDA receptors. *J Neurosci* 31: 11295–11304.
14. Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23: 1151–1158.
15. Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH (2005) Subunit assembly of N-methyl-D-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 280: 24923–24930.
16. Chang HR, Kuo CC (2008) The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci* 28: 1546–1556.
17. Glusker JP (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chem* 42: 1–76.
18. Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17: 5711–5725.
19. Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459: 703–707.
20. Hazes B, Dijkstra BW (1988) Model building of disulfide bonds in proteins with known three-dimensional structure. *Protein Eng* 2: 119–125.
21. Krovetz HS, VanDongen HM, VanDongen AM (1997) Atomic distance estimates from disulfides and high-affinity metal-binding sites in a K⁺ channel pore. *Biophys J* 72: 117–126.
22. McIlhinney RA, Le Bourdelles B, Molnar E, Tricaud N, Streit P, et al. (1998) Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* 37: 1355–1367.
23. Okabe S, Miwa A, Okado H (1999) Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19: 7781–7792.
24. Horak M, Wenthold RJ (2009) Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *J Biol Chem* 284: 9683–9691.
25. Farina AN, Blain KY, Maruo T, Kwiatkowski W, Choe S, et al. (2011) Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *J Neurosci* 31: 3565–3579.
26. Cline DJ, Redding SE, Brohawn SG, Psathas JN, Schneider JP, et al. (2004) New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochemistry* 43: 15195–15203.
27. Inanobe A, Furukawa H, Gouaux E (2005) Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. *Neuron* 47: 71–84.
28. Banke TG, Traynelis SF (2003) Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6: 144–152.
29. Sobolevsky AI, Prodromou ML, Yelshansky MV, Wollmuth LP (2007) Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating. *J Gen Physiol* 129: 509–525.
30. Blanke ML, VanDongen AM (2008) The NR1 M3 domain mediates allosteric coupling in the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 74: 454–465.
31. Kussius CL, Popescu GK (2009) Kinetic basis of partial agonism at NMDA receptors. *Nat Neurosci* 12: 1114–1120.
32. Violes P, Frezou C, Galsomias J, Bonniol A (1972) Etude physicochimique de la tricine et de ses complexes avec les ions de transition Co II, Ni II, Cu II, Zn II. *J Chim Phys Physicochim Biol* 69: 869–874.
33. Stroebel D, Carvalho S, Paoletti P (2011) Functional evidence for a twisted conformation of the NMDA receptor GluN2A subunit N-terminal domain. *Neuropharmacology* 60: 151–158.

1.3. Discussion

1.3.1. Principaux résultats

Arrangement alterné des sous-unités du récepteur NMDA hétérotétramère autour du pore.

Au cours de ce projet, j'ai montré par des approches électrophysiologiques et biochimiques que des rNMDAs GluN1/GluN2A matures, fonctionnels et exprimés à la membrane plasmique, adoptaient un arrangement alterné de type GluN1/GluN2/GluN1/GluN2 autour du pore (Fig.1.5.A). Ainsi, au niveau des ABDs, les sous-unités GluN1 occupent la position proximale par rapport à l'axe de symétrie du récepteur, et les sous-unités GluN2A, les positions distales (Fig.1.5.B,C).

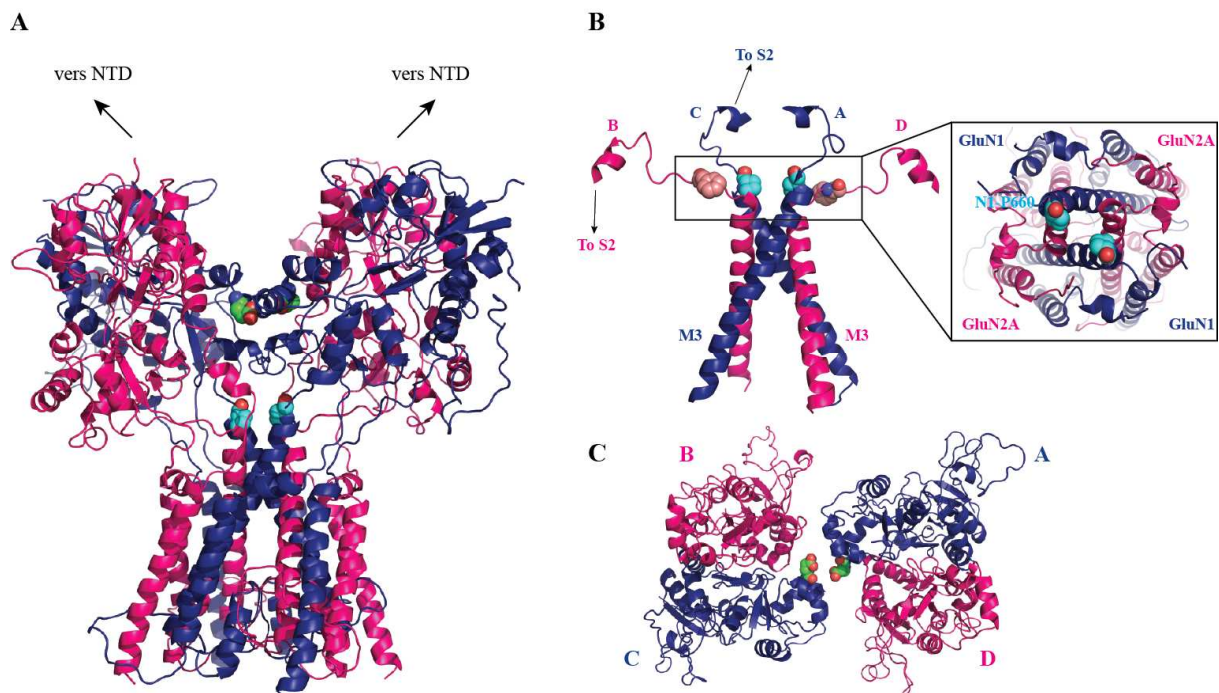


Figure 1.5. Arrangement alterné 1-2-1-2 des sous-unités GluN1 (bleu) et GluN2A (rose) autour du pore. Les résidus étudiés dans notre étude sont représentés, sur ce modèle par homologie d'un rNMDA {ABD+Pore}, en vert (GluN1-E698) ou en cyan (GluN1-P660). **A-** Vue de l'ensemble {ABD-TMD} dans un plan perpendiculaire à celui de la membrane. **B-**Région du pore : représentation latérale des TM 3 et (encart) vue synaptique des TMDs. **C-** Vue synaptique du tétramère d'ABDs, les lobes inférieurs des sous-unités A et C (GluN1) forment l'interface de tétramérisation.

Notre travail est fondé sur l'hypothèse centrale selon laquelle les rAMPA-GluA2 et rNMDAs GluN1/GluN2 partagent le même arrangement global des sous-unités et que les interfaces intra-dimères et inter-dimères dans la couche des ABDs sont similaires. Cette assertion n'est pas sans fondement car les iGluRs exhibent de fortes homologies de séquence, notamment au niveau des ABDs. En outre l'assemblage dimérique des ABDs, ainsi que les mécanismes de liaison des agonistes et d'activation du récepteur, présentent de grandes similitudes (Traynelis et al., 2010 ; Mayer, 2011b). En parvenant à ponter les sous-unités GluN1 par des ponts disulfures, entre ABDs d'une part (Fig.1.5.B), et entre "linkers" M3-S2 d'autre part (Fig.1.5.C), nous avons montré que les lobes inférieurs des sous-unités GluN1 formaient l'interface de tétramérisation entre les deux dimères d'ABDs d'un rNMDA de type GluN1/GluN2A, validant ainsi un arrangement de type 1-2-1-2 des sous-unités autour du pore.

Au cours de ce projet, nous avons également étudié le récepteur mutant GluN1-E698C/GluN2A-Q671C afin de déterminer la faisabilité d'un pontage disulfure entre une sous-unité GluN1 et une sous-unité GluN2A. Nous avons notamment détecté en western-blot, en plus de l'homodimère GluN1, une bande de haut poids moléculaire dont la taille correspond à celle d'un hétérodimère GluN1/GluN2 (~310 kDa ; Fig.1.6.B). La formation d'un hétérodimère par pontage disulfure est en faveur d'un arrangement de type non alterné 1-1-2-2 (Fig.1.6.A), avec les positions proximales occupées par la sous-unité GluN1 d'un dimère et la sous-unité GluN2A de l'autre. Par homologie avec un rAMPA-GluA2, pour lequel, au niveau des ABDs, les sous-unités proximales et distales adoptent des conformations distinctes, un agencement 1-1-2-2 des sous-unités d'un rNMDA suggère qu'une même sous-unité (GluN1 ou GluN2) existe sous deux conformations différentes. Cette organisation serait d'autant plus surprenante qu'elle contredit toute une série de résultats montrant des contributions au fonctionnement du canal ionique propres aux sous-unités GluN1 d'une part et

des sous-unités GluN2 d'autre part (Banke et al., 2003; Sobolevsky et al., 2007; Blanke et al., 2008 ; Kazi et al., 2013).

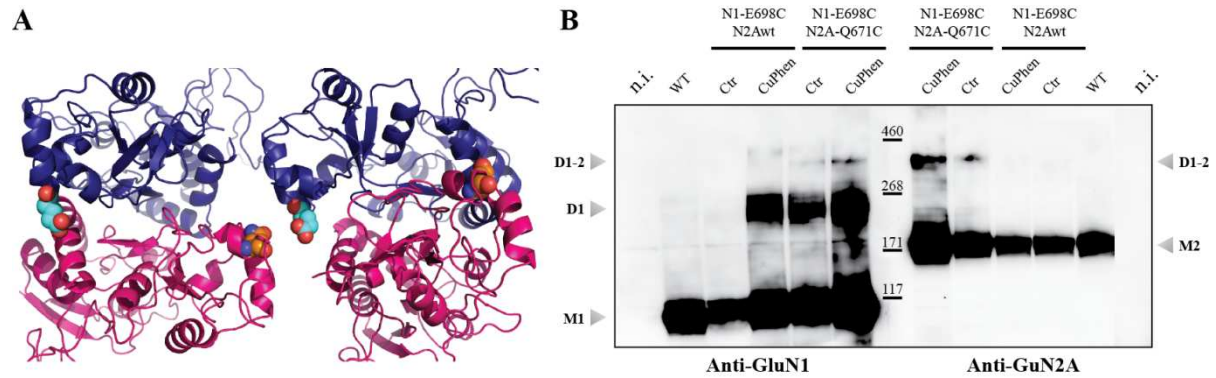


Figure 1.6. Formation d'un hétérodimère GluN1/GluN2A au niveau des ABDs. **A-** Modèle d'un tétramère d'ABDs GluN1/GluN2 représentant l'arrangement non-alterné 1-1-2-2 pour lequel l'interface de tétramérisation fait intervenir une GluN1 et une GluN2. Les mutations GluN1-E698C et GluN2A-Q671C sont représentées en cyan et en orange respectivement. **B-** Immunoblots obtenus à partir d'ovocytes de *Xénope* exprimant le récepteur sauvage, le mutant GluN1-E698C/GluN2Awt ou le mutant GluN1-E698C/GluN2A-Q671C. M1 et M2 indiquent les bandes correspondant aux monomères GluN1 (~ 110 kDa) et GluN2 (~ 180 kDa) respectivement, D1, l'homodimère GluN1 (~ 220 kDa) et D1-2, l'hétérodimère GluN1/GluN2A (~ 300 kDa).

Ce résultat est tout à fait surprenant et il est d'autant plus difficile d'en faire sens qu'il contredit la conclusion principale de notre article. Une des hypothèses envisageable est l'existence d'un mélange de populations. Or, les études fonctionnelles de mutants ayant une cystéine introduite à la fois sur GluN1 et sur GluN2A n'ont pas mis en évidence de phénotype particulier ; au contraire, ces mutants se comportent comme le mutant GluN1-E698C/GluN2Awt, pour lequel les cystéines ne sont présentes que sur la sous-unité GluN1. Ainsi cette donnée biochimique étonnante, arguant d'un arrangement des sous-unités de type 1/1/2/2, est un résultat isolé, qui n'est pour le moment étayé par aucune donnée fonctionnelle.

L'atout cystéine dans les études structure-fonction.

De nombreux travaux décrivant les relations entre structures et fonctions des récepteurs-canaux s'appuient sur la formation de ponts disulfures entre des cystéines introduites par mutagenèse dirigée (Careaga & Falke, 1992). Cette approche permet notamment d'évaluer la proximité de deux sous-unités adjacentes (Krovetz et al., 1997). Par ailleurs, les contraintes exercées par ces liaisons covalentes altèrent le plus souvent les fonctions des macromolécules mutées (Perry & Wetzel, 1984), ce qui permet de corréler certaines caractéristiques structurales avec les propriétés fonctionnelles de la protéine. La formation de ponts disulfures, en modifiant les conductances ioniques, les probabilités d'ouverture, les sensibilités aux agonistes et autres ligands, met en évidence le rôle primordial de la dynamique du récepteur-canal dans l'intégrité de ces fonctions (Krovetz et al., 1997). Par ailleurs, l'étude de l'accessibilité de cystéines par des agents sulfhydryl-spécifiques (composés MTS) donne des renseignements sur l'orientation et l'accessibilité des chaînes latérales des acides aminés (Kürz et al., 1995), et, de manière plus générale, sur l'état conformationnel d'un récepteur dans une situation donnée.

Néanmoins, la substitution d'acides-aminés par des cystéines nécessite certaines précautions. En effet, la présence de cystéines endogènes à proximité des sites de mutations pourrait induire en erreur. Dans le cas des rNMDAs, la sensibilité red-ox du récepteur est contrôlée par deux cystéines de GluN1, C744 et C798. Ces cystéines sont engagées dans un pont disulfure (Sullivan et al., 1994), localisé au niveau du lobe inférieur de l'ABD, proche des segments transmembranaires. Récemment, Talukder et al., (2011) ont démontré que ce pont disulfure jouait un rôle dans le couplage entre la dynamique des ABDs de GluN1 et le "gating" du récepteur. On attribue généralement les effets fonctionnels des traitements réducteurs (DTE ou TCEP) sur les rNMDAs de type sauvage à la cassure de ce pont disulfure C744-C798. D'après notre modèle et la structure cristallographique du dimère d'ABDs GluN1/GluN2A (Furukawa et al., 2005), ces cystéines sont suffisamment éloignées des cystéines introduites dans notre étude pour ne pas interagir avec ces dernières. De même, Salussolia et al. (2011) ont montré que des cystéines introduites au niveau des "linkers" M3-S2 n'interagissaient pas avec celles du pont disulfure endogène.

Afin de promouvoir la formation de ponts disulfures entre les cystéines introduites, notamment au niveau du pore, (mutants GluN1P660C, GluN2A-F656C ; Fig.1.5.C), nous avons incubé ces récepteurs mutés avec un des deux composés oxydants dont on disposait : le DTNB ou le CuPhen. Précisons que les métaux de transition (Zn, Cu, Mg, Ni, Fe, Co...) servent le plus souvent de catalyseur dans les réactions d'oxydation en biologie (Mathews & Walker, 1909), notamment dans l'oxydation de cystéines en cystines par le dioxygène O₂. En effet, dans le complexe Cu(Phen)₂, la phénanthroline, en "attirant" les électrons, change l'état d'oxydation du cuivre, ce qui conduit *in fine* à la formation d'un oxyradical à partir du O₂. Ce radical attaque la liaison -SH des cystéines, puis les radicaux sulfures ainsi formés interagissent pour former un pont disulfure (Careaga & Falke, 1992). Alors que le DTNB n'a induit aucun effet sur l'amplitude des courants mesurés, le CuPhen, quant à lui, a conduit à une inhibition spécifique des récepteurs GluN1-P660C/GluN2Awt de près de 50%. Étonnés d'une telle différence entre les effets des deux traitements oxydants, nous avons souhaité préciser le rôle du cuivre dans l'inhibition observée. En effet, certains groupes fonctionnels dans les protéines, notamment les chaînes latérales des histidines et des cystéines, peuvent servir de sites de chélation pour ces métaux de transition (Glusker et al., 1991). Ainsi, deux cystéines distantes de moins de 7.2 Å (distance entre les C_α, d_{s-s}=3.6 Å ; Holm et al., 1996) peuvent former un site de chélation du cuivre (II). Or d'après notre modèle, les cystéines introduites sur GluN1 à la place des prolines P660 sont séparées par 7 Å, une distance a priori trop grande pour former un pont disulfure mais autorisant néanmoins la formation d'un site pour le cuivre (II). Afin de vérifier cette dernière hypothèse, nous avons réalisé les courbes doses-réponses de l'inhibition des courants en fonction de concentrations croissantes de Cu²⁺ seul. Cette expérience a mis en évidence la très forte affinité du récepteur GluN1-P660C/GluN2Awt pour le cuivre (IC₅₀=0.075 nM vs IC₅₀= 0.19 nM pour le récepteur de type sauvage), et donc l'existence d'un site de chélation du cuivre formé par les cystéines introduites en sortie de canal. Ce résultat écarte donc l'hypothèse d'un pontage disulfure des sous-unités GluN1 qui auraient été catalysées par le CuPhen. En revanche, il donne des informations sur la proximité et l'orientation des cystéines introduites en sortie du canal. En effet, la formation d'un site cuivre par ces deux cystéines confirme qu'elles sont proches l'une de l'autre et suggère que leur chaîne latérale pointe l'une vers l'autre.

En conclusion, il convient d'être vigilant et critique vis à vis des effets observés après une incubation dans un milieu oxydant contenant le complexe cuivre (II) $\text{Cu}(\text{Phen})_2$, les effets observés pouvant ne pas découler de réactions d'oxydo-réduction mais plutôt de complexation de l'ion Cu^{2+} .

Stocks intracellulaires d'homodimères GluN1 et assemblage des récepteurs NMDA

Au cours de ce projet, nous avons été confrontés au problème des stocks intracellulaires d'oligomères de GluN1, dont l'existence avait été prouvée par le passé (Okabe et al., 1999; Horak et al., 2009; Meddows et al., 2001). Il a été montré en effet que les sous-unités GluN1, exprimées seules, peuvent s'assembler en homomères stables dans le réticulum endoplasmique, contrairement aux sous-unités GluN2 qui restent monomériques. Co-exprimées, les sous-unités GluN1 et GluN2 (ou GluN3) oligomérisent et migrent vers la membrane plasmique (Mc Ilhinney et al., 1998; Atlason et al., 2007).

Notre étude s'intéressant à l'arrangement des sous-unités dans un récepteur entier, exprimé à la surface cellulaire et fonctionnel, il était essentiel de s'affranchir autant que possible de ces stocks intracellulaires d'intermédiaires de biogenèse. Le problème majeur s'est posé pour l'approche biochimique (western-blots en conditions dénaturantes non réductrices sur des homogénats d'ovocytes entiers), qui ne permettait pas de distinguer les récepteurs membranaires des récepteurs intracellulaires. Tout dimère stabilisé par des ponts disulfures, qu'il soit intracellulaire ou membranaire, sera disloqué par le DTE, un agent réducteur perméant aux membranes, contrairement au Tris[2-carboxyethyl] phosphine (TCEP), qui ne l'est pas (Cline et al., 2004; Rhee & Burke, 2004; Huh & Wenthold, 1999). L'incubation des ovocytes en présence du TCEP nous assure donc de réduire uniquement les récepteurs exprimés à la surface des cellules. Sur les immunoblots, seule une bande disparaissant à la fois dans les "conditions DTE" et les "conditions TCEP" correspond à un dimère surfacique et fonctionnel. Ce fut le cas avec la bande correspondant à l'homodimère GluN1-E698C, corroborant ainsi les résultats fonctionnels que nous avons obtenus.

Une autre approche a également été envisagée afin de s'affranchir de ces stocks d'homodimères GluN1 intracellulaires. Nous avons en effet tenté de séparer puis préparer les membranes à partir d'ovocytes entiers, et de ne réaliser les western-blots que sur des extraits de membranes plasmiques purifiées. Malheureusement cette technique est assez difficile à mettre en œuvre et, jusqu'à présent, nous ne sommes pas parvenus à des résultats réellement satisfaisants.

Il est probable que la formation d'homodimères GluN1 intracellulaires constitue une étape essentielle dans l'assemblage et la maturation des rNMDAs (Fig.1.7 et voir Fig.3.5 de l'Introduction ; Meddows et al., 2001 ; Papadakis et al., 2004, Qiu et al., 2005 ; Farina et al., 2011). Cet assemblage impliquerait essentiellement les NTDs des sous-unités. Dans une récente étude, associant cristallographie et microscopie électronique sur domaines isolés, Farina et al. révèlent que l'homodimérisation des NTDs de GluN1 (Fig.1.7) est un élément crucial de l'assemblage du récepteur et que cet homodimère se réorganise durant la biogenèse des rNMDAs pour former un hétérodimère fonctionnel (Introduction Fig. 3.4.C). Bien que ce rôle des NTDs ait été aussi observé lors de la biogenèse des rAMPAs (Ayalon & Stern-Bach, 2001; Ayalon et al., 2005), cette réorganisation des sous-unités (d'un homodimère GluN1 à un hétérodimère GluN1/GluN2) durant la biogenèse n'a été démontrée que pour les rNMDAs.

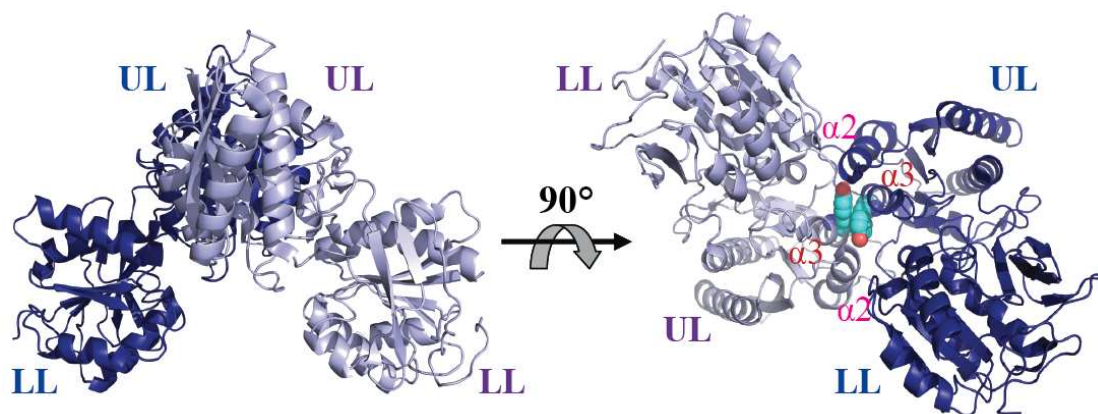


Figure 1.7. Structure cristallographique d'un homodimère de NTDs de GluN1 (pdb 3Q41) montrant la dimérisation des lobes supérieurs (UL) des NTDs ; vue perpendiculairement au plan de la membrane (gauche) et vue synaptique (droite). D'après Farina et al., 2011.

1.3.2. Quid des autres sous-types de récepteurs NMDA ?

Dans notre étude, nous avons démontré que, dans un rNMDA de type GluN1/GluN2A, les deux sous-unités GluN1 sont disposées de façon diagonale autour du pore (agencement 1-2-1-2 ; Fig. **1.4.B**). Cet arrangement est-il conservé dans d'autres sous-types de rNMDAs notamment ceux contenant les sous-unités GluN2B, GluN2C ou GluN2D ?

Dans un premier temps nous avons sondé la proximité des ABDs des sous-unités GluN1 dans un rNMDA GluN1/GluN2B en utilisant une approche identique à celle développée dans notre publication (Riou et al., 2012 ; Fig. 3). Ainsi, nous avons déduit des cinétiques d'inhibition par le MK-801 que la probabilité d'ouverture des récepteurs GluN1-E698C/GluN2Bwt était significativement diminuée, par rapport à celle d'un récepteur de type sauvage, et que cette probabilité d'ouverture était affectée par le traitement réducteur (DTE) des récepteurs (constante de temps d'inhibition réduite d'un facteur deux) (Fig. **1.8.A**). Le comportement des récepteurs GluN1-E698C/GluN2Bwt reproduit donc les résultats obtenus avec les récepteurs GluN1-E698C/GluN2Awt. Cela suggère que, dans un récepteur GluN1/GluN2B fonctionnel, ce sont de nouveau les sous-unités GluN1 qui forment l'interface de tétramérisation des ABDs, ce qui validerait un arrangement de type alterné 1-2-1-2 (Fig. **1.4.B**). Néanmoins il ne s'agit là que de résultats préliminaires. Divers contrôles sont nécessaires, notamment des mesures systématiques des constantes d'inhibition par le MK-801 pour les récepteurs N1wt/N2Bwt et N1wt/N2B-Q672C, avant et après un traitement réducteur.

En ce qui concerne les récepteurs GluN1/GluN2C et GluN1/GluN2D en revanche, il est possible que des différences structurales soient observées. En effet, contrairement aux récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B qui présentent une forte homologie de séquence, les rNMDAs contenant GluN2C ou GluN2D se démarquent par leurs séquences particulièrement différentes qui pourraient se traduire par un arrangement distinct de leurs sous-unités dans le récepteur entier. Aussi avons-nous testé la sensibilité au cuivre (Cu^{2+}) des récepteurs GluN1-P660C/GluN2C (données non montrées) et GluN1-P660C/GluN2D (Fig.

1.8.B) afin d'évaluer, comme pour les rNMDAs GluN1/GluN2A, la proximité des sous-unités GluN1 autour du pore. Dans les deux cas, un site de chélation du cuivre de haute affinité est effectivement créé. En effet, seuls les récepteurs contenant la mutation GluN1-P660C sont inhibés par des concentrations croissantes de cuivre Cu^{2+} , les récepteurs de type sauvage n'étant pas (ou peu) affectés. Ces résultats similaires à ceux obtenus pour les récepteurs GluN1/GluN2A sont en faveur d'un arrangement de type alterné 1-2-1-2 avec les sous-unités GluN1 formant l'interface de tétramérisation en sortie de pore. Cependant ce résultat ne pourra être validé qu'après avoir évalué l'inhibition par le cuivre des récepteurs contrôles GluN1wt/GluN2C-Y656C et GluN1wt/GluN2D-Y681C.

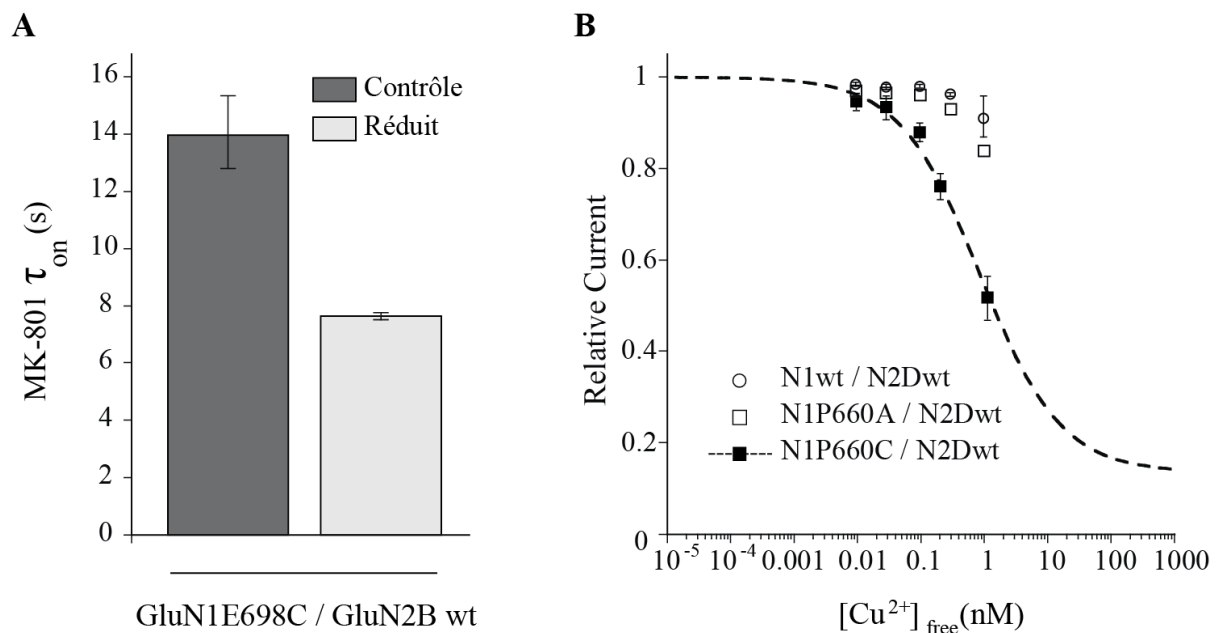


Figure 1.8. Des données fonctionnelles en faveur d'un arrangement alterné des sous-unités dans un récepteur GluN1/GluN2B (A) et GluN1/GluN2D (B). (A) Cinétiques d'inhibition absolue par le MK-801 pour le récepteur GluN1-E698C/GluN2Bwt, mesurées avant (foncé) et après (clair) incubation des récepteurs en milieu réducteur (TCEP, 5 mM). **B-** Courbe dose-réponse représentant l'inhibition des courants par des concentrations croissantes de Cu^{2+} (nM), pour les récepteurs GluN1-P660C/GluN2Dwt, GluN1-P660A/GluN2Dwt et le récepteur de type sauvage. Seules les données pour le mutant cystéine ont pu être "fittées", la valeur maximale de l'inhibition étant estimée à 86 %. Des résultats similaires ont été obtenus en combinant GluN1-E698C à la sous-unité GluN2C (inhibition maximale de 44 %).

Ces résultats corroborent l'étude publiée peu avant par Salussolia et al. (2011). L'approche développée dans cet article est similaire à la nôtre. Ainsi, les auteurs ont introduit des cystéines sur les "linkers" reliant le TMD à l'ABD (M3-S2 et S2-M4), afin de sonder la proximité des sous-unités mutées en sortie de pore. En effet, d'après la structure du récepteur AMPA-GluA2, ces "linkers" adoptent des conformations et des longueurs différentes selon la sous-unité, proximale ou distale. Seules les sous-unités proximales sont susceptibles de former un pont disulfure. Par des western-blots sur cellules HEK et des mesures de courant sur ovocytes (en présence d'agonistes ou antagonistes), les auteurs ont montré que les sous-unités GluN1 pouvaient être pontées, en conformation ouverte comme fermée. Ils proposent ainsi l'existence d'un arrangement de type alterné GluN1/GluN2/GluN1/GluN2, notamment pour les récepteurs GluN1/GluN2C et GluN1/GluN2A exprimés à la membrane plasmique.

L'ensemble de ces données suggèrent donc que les différents sous-types de rNMDAs GluN1/GluN2A-D partagent une même organisation au sein d'un récepteur tétramérique entier et fonctionnel, avec un arrangement des sous-unités de type alterné 1-2-1-2. Pour chacun de ces récepteurs, la sous-unité GluN1 serait la sous-unité impliquée dans l'interface de tétramérisation du récepteur autour du pore puisqu'elle occuperait la position proximale dans la couche des ABDs (paire A/C).

1.3.3. L'arrangement des récepteurs GluN1/GluN2 : la controverse relancée

Pourtant, l'arrangement des sous-unités d'un rNMDA hétérotétramérique fait encore débat. Tandis que les premières publications (Schorge & Colquhoun, 2003 ; Qiu et al., 2005), décrivaient un agencement des sous-unités GluN1 et GluN2 du type 1-1-2-2 (Fig. **1.4.A**), les études récentes (Riou et al., 2012 ; Salussolia et al., 2011 ; Sobolevsky et al., 2009 ; Rambhadran et al., 2010) ont mis en évidence un arrangement de type 1-2-1-2 (Fig. **1.4.B**). Alors que cet arrangement était admis par la communauté scientifique, de nouvelles données viennent d'être publiées par Balasuriya et al., (2013), proposant un arrangement 1-1-2-2 des

sous-unités GluN1 et GluN2 dans un rNMDA entier et exprimé à la membrane plasmique (Fig. 1.9).

La méthode utilisée repose sur l'imagerie par AFM (Microscopie à Force Atomique) de particules uniques de récepteurs exprimés en cellules HEK puis purifiés. La première étape consiste à incorporer des "tags" sur les sous-unités du récepteur étudié et exprimé en cellules HEK (Fig. 1.9.A). Ensuite, les membranes des cellules transfectées sont solubilisées dans un détergent puis les récepteurs, isolés par chromatographie d'adsorption, sont incubés avec des anticorps spécifiques. Ce sont ces complexes sous-unité/anticorps qui sont déposés sur une plaque de mica puis imagés par Microscopie à Force Atomique. L'AFM est une technique de microscopie à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon avec une résolution nanométrique : la pointe d'une petite sonde nanométrique, fixée sous un micro-levier, balaye la surface de l'échantillon à analyser ce qui permet d'obtenir une image tridimensionnelle du matériau analysé. Ces mesures permettent notamment d'évaluer le volume et le poids des particules à une résolution de 30 Å et 1 nm respectivement (Fig. 1.9.B) et d'accéder ainsi aux états d'oligomérisation de la protéine étudiée.

Un rNMDA contient le plus souvent deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2 : un complexe tétramérique rNMDA contient donc plusieurs copies d'une même sous-unité. Ainsi les récepteurs doublement décorés (soit sur GluN1, soit sur GluN2A) sont identifiés, sélectionnés, et les angles entre deux "décorations" mesurés (Fig. 1.9.C). La distribution en fréquence des angles détectés donne alors des indications sur la disposition des sous-unités dans le complexe : un angle de 90° entre anticorps suggère que les sous-unités décorées sont adjacentes tandis qu'un angle de 180° décrit plutôt des sous-unités diamétralement opposées. Cette méthode a déjà été utilisée avec succès pour déterminer la stœchiométrie et l'arrangement d'autres récepteurs-canaux (Barrera et al., 2008 ; Antonio et al., 2011 ; Stewart et al., 2012 et 2011 ; Carnally et al., 2008). Elle a notamment permis de mettre en évidence, pour la première fois, la nature trimérique des récepteurs P2X, pour lesquels les décorations par anticorps formaient un angle de 120° (Barrera et al., 2005). L'avantage de cette méthode est qu'elle ne dépend d'aucun modèle par homologie. Dans le cas des rNMDAs, aucune hypothèse sur la structure du récepteur GluN1/GluN2A n'a été émise par les auteurs pour mettre en place leurs expériences et interpréter leurs signaux.

Les auteurs ont décoré les sous-unités GluN1 et GluN2A séparément, avec différents anticorps, dirigés soit vers les NTDs soit vers les ABDs des sous-unités (Fig. **1.9.A**). Quelle que soit la sous-unité et les domaines décorés, la distribution des angles est majoritairement centrée sur la valeur 90° (Fig. **1.9.D et E**). Seul un arrangement de type non alterné 1-1-2-2 avec les sous-unités identiques adjacentes permet d'interpréter ce résultat. Cependant, sachant qu'il existe des stocks intracellulaires d'homomères GluN1, les auteurs, dans une dernière expérience, ont purifié les membranes afin d'isoler les récepteurs surfaciques. De la même façon, ils détectent un angle de 90° entre les sous-unités décorées. Concernant les rAMPAs, les auteurs observent bien pour un récepteur homomérique AMPA-GluA2 un angle de 90° entre deux sous-unités adjacentes et un angle de 180° entre les sous-unités en diagonale. En ce qui concerne les rAMPAs hétéromériques GluA1/GluA2, l'ensemble des mesures convergent vers un angle unique de 180° entre les anticorps anti-GluA1. Ce résultat suggère que deux sous-unités identiques, GluA1 d'une part et GluA2 d'autre part, sont diamétralement opposées dans un rAMPA hétéromérique, ce qui confirme les données obtenues par Mansour et al. il y a une dizaine d'années (Mansour et al., 2001). Ces diverses observations suggèrent donc un arrangement non-alterné des sous-unités GluN1 et GluN2A d'un rNMDA. En revanche, leur méthode ne permet pas de déterminer quelles sous-unités participent à l'interface de tétramérisation des ABDs ou des NTDs autour du pore.

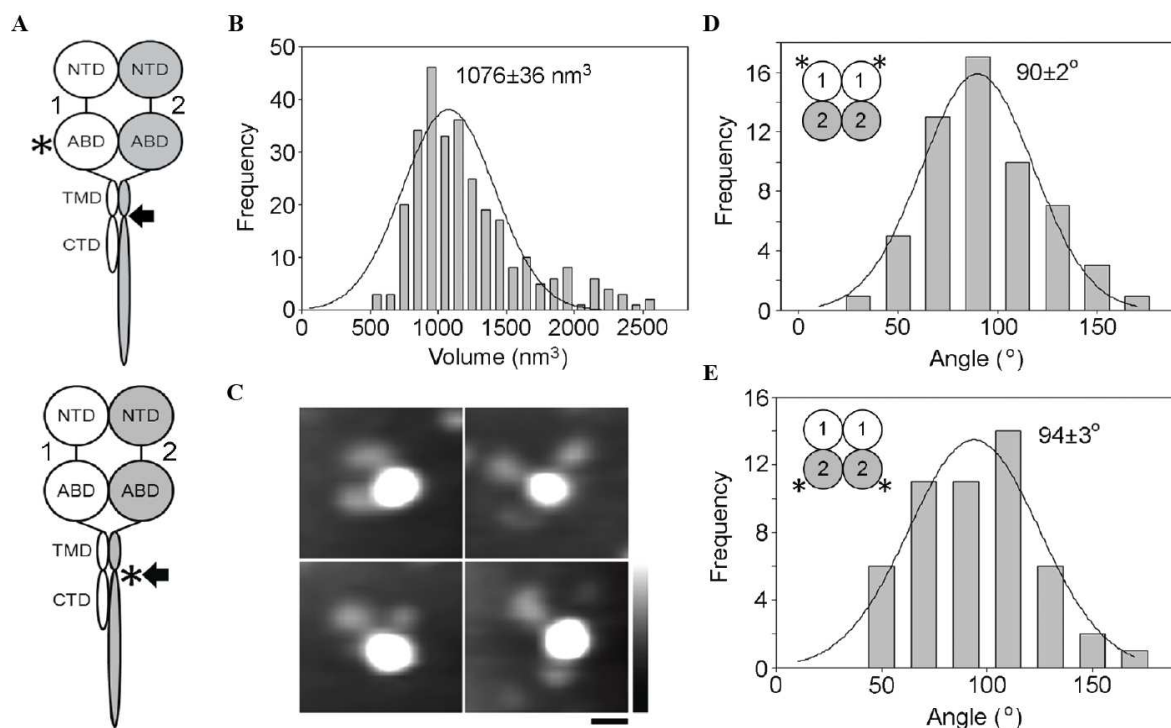


Figure 1.9. Des données AFM suggèrent un arrangement non alterné des sous-unités GluN1 et GluN2A dans un récepteur NMDA entier. **A-** Représentation schématique d'un hétérodimère GluN1/GluN2A : les récepteurs sont isolés par l'intermédiaire d'un "tag" (ici FLAG/His₈ situé en aval du TMD) et décorés par des anticorps dirigés soit vers l'ABD de GluN1 (**haut**) soit le CTD de GluN2A (**bas**). **B-** Distribution en fréquences des volumes moléculaires des particules décorées par l'anticorps GluN1. La courbe de Gauss est centrée sur la valeur 1076 nm³, correspondant au volume attendu pour un hétérotétramère GluN1/GluN2A. **C-** Images obtenues par AFM montrant des récepteurs doublement décorés, par l'anticorps anti-GluN1. **D et E-** Distribution en fréquences des angles mesurés entre deux décorations successives. Les courbes de Gauss sont centrées sur la valeur 90°. Cette valeur représente l'angle formé par deux sous-unités GluN1 successives (**D**) ou deux sous-unités GluN2 successives (**E**). *D'après Balasuriya et al., 2013.*

Les auteurs ont multiplié les contrôles afin de confirmer leurs observations. Malgré tout, leur méthode ne leur permet de détecter à chaque fois que 0,5 à 30 % de récepteurs décorés par deux anticorps. A quoi correspondent les autres particules ? Ces récepteurs doublement décorés sont-ils vraiment des tétramères ? L'étalement de la courbe de Gauss de la répartition des volumes (Fig. **1.9.B**) suggère au contraire la coexistence de multiples complexes et états d'oligomérisation. De même la répartition des angles mesurés entre les sous-unités décorées est très dispersée (courbe centrée sur 90° environ, avec une largeur à mi hauteur de 70° ; Fig. **1.9.D**). Enfin, il est « statistiquement » surprenant que les auteurs ne détectent jamais l'angle 180°. En raison de ce manque de précision, il est difficile de conclure avec certitude à l'existence unique d'un arrangement de type 1-1-2-2 pour un rNMDA tétramérique entier. Par ailleurs, les auteurs suggèrent que les sous-unités s'arrangent selon l'ordre 1-1-2-2, à la fois dans la couche des ABDs mais aussi dans celle des NTDs. En effet, les angles mesurés entre les anticorps sont les mêmes, que l'anticorps soit dirigé contre l'ABD ou contre le NTD d'une sous-unité. Cette affirmation contredit donc la structure du tétramère de NTDs GluN1/GluN2B cristallisé récemment montrant un arrangement alterné 1/2/1/2 (Karakas et al., 2011).

Cependant il faut avouer que ces résultats, en contradiction avec nos propres conclusions et celles de nos collègues (Sobolevsky et al., 2009 ; Salussolia et al., 2011, etc) nous ont troublés. En effet, la vaste majorité de nos résultats expérimentaux, tant électrophysiologiques que biochimiques, sont expliqués de la façon la plus simple par un arrangement alterné 1-2-1-2 (Fig. **1.10.C**, **bas**). Nous avons donc repris une à une nos

observations, notamment les tests fonctionnels effectués sur les récepteurs ayant incorporé une cystéine à la position GluN1-E698C. Nous avons notamment évalué la sensibilité des récepteurs au glutamate, agoniste des rNMDAs se fixant sur les ABDs des sous-unités GluN2A. L'insertion d'une cystéine, que ce soit sur la sous-unité GluN1 (E698C) et/ou sur la sous-unité GluN2A (Q671C) n'affecte pas la sensibilité du récepteur au glutamate par rapport à un récepteur de type sauvage (Fig. **1.10.A**). Ce résultat est cohérent avec un pontage disulfure n'impliquant pas les sous-unités GluN2 fixant le glutamate mais les sous-unités GluN1 uniquement, ces dernières fixant la glycine. Les ABDs des sous-unités GluN2, alors libres de se mouvoir lors de la liaison du glutamate, peuvent ainsi participer normalement à l'activation du récepteur.

A contrario, l'affinité pour la glycine du rNMDA GluN1-E698C/GluN2Awt est fortement diminuée par rapport à celle du rNMDA de type sauvage et celle de notre contrôle GluN1-E698A/GluN2Awt (les valeurs respectives de l' EC_{50} (μ M) sont : 19.1 ; 2.51 ; 3.66). Or, on s'attend à ce que le pontage disulfure entre deux sous-unités GluN1, qui lie la glycine, rende la fermeture des ABDs difficile et affecte donc l'activation du récepteur. La baisse de sensibilité pour la glycine serait une conséquence logique de cette contrainte exercée sur les ABDs. Ce résultat est donc un argument supplémentaire en faveur d'un pontage disulfure impliquant les sous-unités GluN1 et donc d'une position proximale de ces sous-unités autour du pore (Fig. **1.10.B**). Cependant, le "fit" avec une seule composante (isotherme) des courbes dose-réponse glycine pour le récepteur GluN1-E698C/GluN2Awt est relativement mauvais ($R^2=0.995$). Nous avons donc réitéré cette expérience mais cette fois-ci, lors du traitement des données, nous avons effectué une régression des points correspondant au mutant GluN1-E698C/GluN2Awt avec deux composantes au lieu d'une. Ce nouveau "fit" donne de bien meilleurs résultats ($R^2 = 0.9996$) (Fig. **1.10.D**). La première phase de la courbe représente 83% des courants et décrit une population ayant une affinité pour la glycine ($EC_{50} = 2.65 \mu$ M) proche de celle du récepteur GluN1-E698A/GluN2Awt ($EC_{50} = 3.66 \mu$ M). La seconde phase de la courbe représente une population beaucoup moins sensible à la glycine ($EC_{50} = 109.9 \mu$ M) et qui contribue à 17 % du courant mesuré. Cette analyse suggère donc la coexistence de deux populations de récepteurs pour le mutant GluN1-E698C/GluN2Awt. Que représentent ces deux populations ? Deux cas de figure sont envisageables. Soit les deux populations sont décrites par un même arrangement des sous-unités mais seule une partie des récepteurs (deuxième composante de faible affinité) est pontée. Soit chacune des deux populations représente un type de récepteurs avec un

arrangement des sous-unités différent (Fig. **1.10.C**). Selon cette hypothèse, la première composante reflèterait un arrangement du type 1-1-2-2 (Fig. **1.10.C, haut**) non ponté et non pontable (les positions proximales sont occupées par l'ABD d'une sous-unité GluN1-E698C et celui d'une sous-unité GluN2Awt) et la seconde composante, un arrangement du type 1-2-1-2 (Fig. **1.10.C, bas**) dont les sous-unités GluN1, proximales, sont pontées au niveau des ABDs.

Afin de tenter de discriminer entre ces deux cas possibles, nous avons regardé si un traitement oxydant (par le CuPhen) des récepteurs modifiait la première composante. Si tel est le cas, alors elle correspondrait à une population pouvant former des ponts disulfures, donc "de type 1-2-1-2" mais dont tous les récepteurs ne pontent pas spontanément. Avant et après incubation en milieu oxydant, les affinités pour la glycine de la première population sont identiques ($EC_{50} = 2.65$ vs $2.47 \mu\text{M}$ respectivement). En revanche, la contribution au courant de cette population de haute affinité pour la glycine diminue après traitement (67% vs 83% avant oxydation). Cette fraction de récepteurs modifiés (16%) correspond très probablement à des rNMDAs avec un arrangement alterné mais dont les cystéines n'avaient pas réagi spontanément (Fig. **1.10.D**). Malheureusement, ce contrôle n'est pas totalement concluant; en effet il reste toujours un pourcentage significatif de récepteurs se comportant comme les récepteurs GluN1-E698A/GluN2Awt (haute affinité pour la glycine). Nous ne pouvons pas déterminer, à ce stade, si ces récepteurs constituent une population à part entière, avec un arrangement de leurs sous-unités de type 1-1-2-2 où si une seule population existe (avec un arrangement de type 1-2-1-2) mais que certains de ces récepteurs ne forment pas de pontages disulfures.

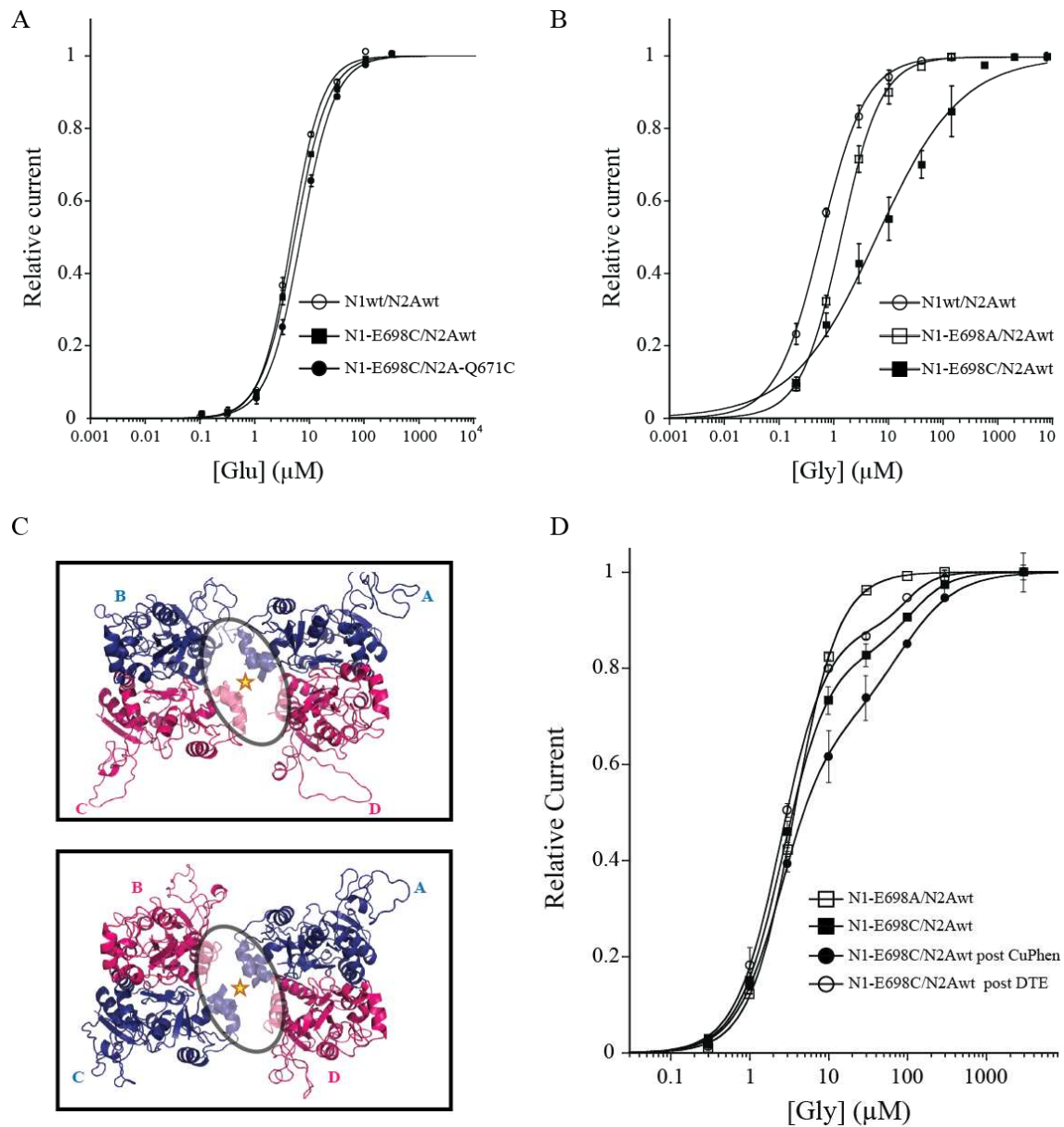


Figure 1.10. Le pontage disulfure a un impact sur l'affinité des récepteurs NMDAs pour leurs agonistes. **A et B-** Courbes doses-réponses des courants mesurés en fonction de la concentration en agoniste, pour les récepteurs, GluN1wt/GluN2Awt, GluN1-E698A/GluN2Awt, GluN1-E698C/GluN2Awt et GluN1-E698C/GluN2A-Q671C. **(A)** L'affinité pour le glutamate des récepteurs contenant GluN1-E698C est identique à celle des récepteurs de type sauvage ($EC_{50} \sim 4\text{-}7 \mu\text{M}$). **(B)** L'affinité de GluN1-E698C/GluN2Awt pour la glycine est significativement réduite ($EC_{50} = 19.1 \mu\text{M}$, $n_H = 0.65$) par rapport au contrôle alanine ($EC_{50} = 3.66 \mu\text{M}$, $n_H = 1.38$). **C-** Une analyse approfondie de ces courbes doses-réponses à la glycine pourrait nous aider à discriminer entre les deux arrangements 1-1-2-2 (haut) ou 1-2-1-2 (bas) des sous-unités GluN1 (bleues) et GluN2A (roses) au niveau des ABDs. **D-** Courbe doses-réponses à la glycine pour GluN1-E698A/GluN2Awt et pour le mutant GluN1-E698C/GluN2Awt, réalisées avant traitement (carrés pleins) ou après incubation des récepteurs avec un oxydant (rond pleins) ou un réducteur (ronds vides). Hormis pour le mutant alanine, les données ont été "fittées" avec une double composante permettant de séparer deux populations, une première de haute affinité pour la glycine et une deuxième de plus faible affinité.

Bien que nous ne soyons pas parvenus à déterminer avec exactitude l'existence de deux arrangements possibles dans un rNMDA, la piste des courbes dose-réponse biphasiques était intéressante. Même si cette hypothèse de deux populations de rNMDAs fonctionnels aux structures différentes semble surprenante, elle n'est pas à exclure et mérite donc d'être approfondie.

1.3.4. Perspectives

Malgré de nombreuses études, dont la nôtre, en faveur d'un arrangement de type 1-2-1-2 des sous-unités autour du pore dans un rNMDA, celui-ci est encore contestée. Même si des études complémentaires permettraient de clarifier le débat, seule la cristallisation d'un rNMDA GluN1/GluN2 entier pourra mettre définitivement un terme à la controverse. En outre, toutes ces études visant à déterminer l'arrangement des sous-unités dans un rNMDA ont été réalisées en système recombinant (ovocytes de *Xénope* ou cellules HEK). Des mesures électrophysiologiques et/ou observations structurales sur des préparations plus "natives" (neurones en culture notamment) seront nécessaires avant de pouvoir conclure à l'existence d'un arrangement ou un autre. Déterminer l'arrangement des sous-unités dans un récepteur iGluR entier est une première étape vers la connaissance de l'organisation globale du récepteur. Si la structure et le rôle des dimères d'ABDs et de NTDs ont été largement étudiés, les travaux concernant leur arrangement deux à deux dans un complexe rNMDA tétramériques n'en sont encore qu'à leurs balbutiements.

Connaître l'arrangement tétramérique d'un rNMDA entier permettra ainsi d'interpréter, d'un point de vue structural et mécanistique, les phénomènes d'activation, de désactivation, de désensibilisation et de modulation allostérique qui caractérisent ces récepteurs. Enfin, les nouvelles interfaces entre sous-unités, qui sont mises en évidence dans ces travaux, sont autant de potentielles cibles thérapeutiques pour des composés pharmacologiques spécifiques.

1.3.5. Asymétrie structurale et fonctionnelle des sous-unités dans un récepteur-canal du glutamate

Asymétrie structurale dans un rAMPA homomérique

La caractéristique la plus inattendue révélée par la structure cristallographique du rAMPA-GluA2 est l'asymétrie qui régit l'ensemble du complexe homomérique (voir Introduction **2.2.6.2** et Résultats **1.1.2**). Dans ce récepteur les quatre sous-unités (A-D) ne partagent pas la même structure alors qu'elles ont une séquence protéique strictement identique. En réalité, le récepteur entier est constitué de deux paires de sous-unités de conformations différentes (paire A/C versus paire B/D). Cette non-équivalence des sous-unités sous-entend des contributions différentes de chaque paire aux mécanismes d'activation, de désactivation et de désensibilisation du rAMPA (Dong et al., 2011). Les différences de structure entre les sous-unités A/C et B/D proviennent essentiellement de ces polypeptides de moins de vingt acides aminés, appelés "linkers", qui relient les NTDs, ABDs et TMDs (Fig **1.11**). Il est intéressant de noter que ces "linkers", et notamment ceux connectant les segments transmembranaires (M1-4) aux lobes inférieurs (S2) des ABDs sont impliqué(e)s dans les propriétés fonctionnelles des iGluRs. Plus précisément, ces polypeptides, en assurant les changements de symétrie entre les ABDs (ordre deux) et les TMDs (ordre quatre) permettent de traduire les mouvements des ABDs en ouverture/fermeture du canal ionique. (Fig. **1.11** ; Dong et al., 2011).

Cette asymétrie est d'autant plus intrigante pour un récepteur hétérotétramérique. Prenons par exemple un rAMPA de type GluA1/GluA2, dont les sous-unités identiques sont disposées diagonalement (Mansour et al., 2001, Balasuriya et al., 2013). D'après la structure du rAMPA-GluA2 homomérique, les sous-unités GluA1 d'une part et GluA2 d'autre part auront des conformations différentes. Il est fort à parier que leurs contributions respectives à l'activité du canal ionique présentent elles aussi des spécificités.

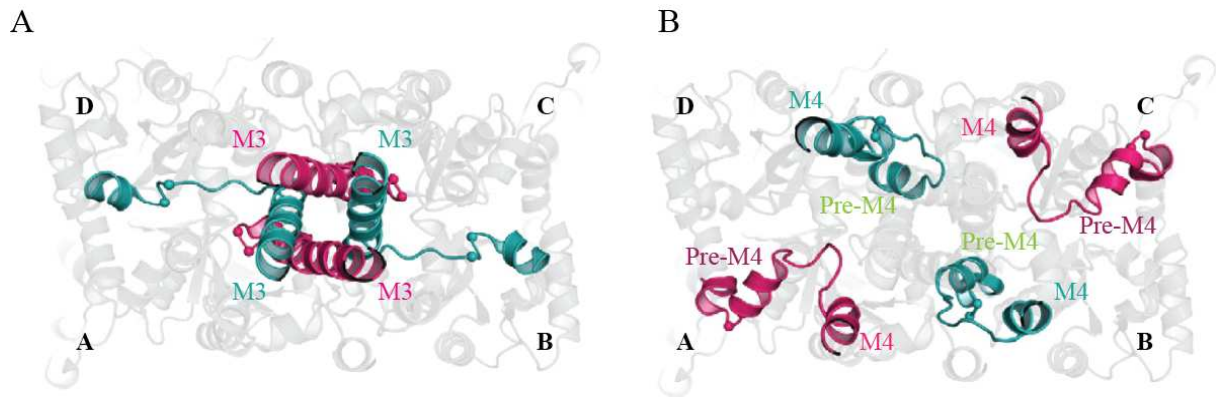


Figure 1.11. Les "linkers" reliant les ABDs des quatre sous-unités du récepteur AMPA-GluA2 aux segments transmembranaires s'adaptent à la rupture de symétrie entre les domaines extracellulaires et le pore. Vues cytoplasmiques des "linkers" M3-S2 (A) et S2-M4 (B), des sous-unités A/C (roses) et B/D (vertes). Les ombres grises représentent les quatre ABDs GluA2. D'après Sobolevsky et al., 2009.

Les sous-unités GluN1 et GluN2 ne contribuent pas de la même façon à l'activité d'un récepteur NMDA

Notre étude a montré que, dans le cas d'un rNMDA, les sous-unités GluN1 et GluN2A s'arrangeaient autour du pore selon un ordre 1-2-1-2. En reprenant les notations du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009), les sous-unités GluN1, proximales, adoptent une conformation du type A/C et les sous-unités GluN2A, distales, une conformation du type B/D (Fig. 1.4.B). Cette asymétrie du récepteur, avec deux couples de sous-unités structurellement différents, corrobore une série de données fonctionnelles qui mettent en évidence une contribution différentielle de GluN1 et GluN2 au contrôle de l'activité du canal ionique (Sobolevsky et al., 2007 ; Banke et al., 2003 ; Blanke et al., 2008, Kussius & Popescu, 2009 ; Watanabe et al., 2002 ; Kazi et al., 2013). La plupart de ces études se sont intéressées aux rôles respectifs des "linkers" connectant les segments transmembranaires aux ABDs des sous-unités GluN1 et GluN2, dans l'activité d'un rNMDA. Ainsi les "linkers" M3-S2, formant le cœur du vestibule extracellulaire, sont directement impliqués dans le couplage « ABD-pore », de même que les "linkers" S1-M1 et S2-M4, plus périphériques et exposés à l'espace extracellulaire, sont dynamiques lors de l'activation des rNMDAs (Kazi et al., 2013).

Récemment Dai et al., (2013) ont développé, à partir de simulations de dynamique moléculaire, un modèle atomistique décrivant l'activation d'un rNMDA GluN1/GluN2A (sans les NTDs). Lorsque les lobes inférieurs (S2) des ABDs se referment sur leur ligand, la tension exercée sur les "linkers" S2-M3 induit un écartement des hélices M3 conduisant à l'ouverture du canal. Les auteurs ont montré que les mouvements de translation des hélices M3 des sous-unités distales GluN2A contribuaient plus à l'ouverture du canal, et donc à l'activation de récepteur, que les mouvements rotationnels des hélices M3 des sous-unités proximales GluN1.

L'ensemble de ces travaux met ainsi en évidence le lien entre l'asymétrie structurale des rNMDAs et les contributions différentielles des sous-unités à l'activation du récepteur (Traynelis et al., 2010) et à certaines propriétés des rNMDAs telles que la perméabilité ionique (Watanabe et al., 2002). Il est clair cependant que malgré leurs rôles distincts, il existe une concertation entre les sous-unités GluN1 et GluN2, concertation qui est indispensable dans le cas de rNMDAs dont le canal ionique ne peut s'ouvrir que si les quatre sous-unités ont leur ABD lié à l'agoniste.

Généralisation à d'autres récepteurs-canaux du glutamate : les récepteurs kainate

Concernant les rKAs, comme pour les rAMPA, certaines sous-unités (GluK1, GluK2, GluK3) peuvent former des récepteurs homomériques fonctionnels, tandis que d'autres (GluK4, GluK5) doivent s'assembler à une sous-unité GluK1-3 pour pouvoir constituer des rKAs hétéromériques fonctionnels. Si plusieurs dimères de NTDs ont déjà été cristallisés (Kumar & Mayer, 2009 (GluK2) ; Kumar et al., 2010 (GluK3) ; Kumar et al., 2011 (GluK5 et GluK2/GluK5)), seul quelques dimères d'ABDs ont été cristallisés, notamment celui des l'homodimères GluK2 (Chaudhry et al., 2009b ; Fig 1.12.A) et GluK3 (Venskutonyte et al., 2013), en complexe avec le glutamate. Jusqu'à présent, la disposition des sous-unités au sein d'un récepteur complet n'a donc été déduite que d'études fonctionnelles sur des rKAs homomériques ou hétéromériques.

En 2010, Das et al. montrent, par des pontages disulfures entre ABDs d'une part et NTDs d'autre part, que l'arrangement des sous-unités GluK2 dans un rKA homomérique était similaire à celui des sous-unités GluA2 dans le rAMPA cristallisé (Sobolevsky et al., 2009 ; Das et al., 2010). Leurs expériences ont également mis en évidence les contributions différentielles des sous-unités proximales et distales à l'activation et à la désensibilisation des rKA, (Fig. 1.12.B).

Retrouve-t-on cette asymétrie structurale et fonctionnelle dans un rKA hétéromérique du type GluK1-K3/GluK4-K5 ? La structure cristallographique d'un tétramère de NTDs GluK2/GluK5 suggère, en tout cas, un arrangement des sous-unités au niveau des NTDs, semblable à celui observé dans la structure du rAMPA homomérique, avec les sous-unités GluK5 distales et les sous-unités GluK2 proximales, par rapport au pseudo-axe de symétrie des NTDs (Kumar et al., 2011). Par analogie avec le rAMPA-GuA2, les sous-unités GluK5 correspondent à la paire A/C et les sous-unités GluK2 à la paire B/D. L'interface de tétramérisation des NTDs dans le rKA hétérotétramérique est donc assurée par les sous-unités GluK2. Ne disposant pas de structure cristallographique d'hétérodimère ou d'hétérotétramère d'ABDs de rKAs, nous devons déduire l'arrangement des sous-unités autour du pore par d'autres approches. Récemment, Veran et al (2012) ont ainsi montré que le zinc extracellulaire potentialisait les rKAs GluK2/GluK3 en stabilisant l'interface de dimérisation entre un ABD de GluK2 et un ABD de GluK3. Selon les auteurs, les sous-unités GluK2 et GluK3 de ce rKA hétérotétramérique s'arrangent donc en dimère d'hétérodimères GluK2/GluK3 autour du pore.

Cet arrangement asymétrique se reflète-t-il dans l'activité des rKAs ? Il a été montré que l'activation des rKAs suivait un mécanisme similaire à celui d'un rAMPA, avec notamment une indépendance des sous-unités les unes par rapport aux autres (Rosenmund et al., 1998 ; Swanson et al., 2002). Ainsi dans un récepteur GluK2/GluK4, la liaison du glutamate sur GluK4 induit l'ouverture du canal ionique du rKA, tandis que la liaison de l'agoniste sur GluK2 provoque sa désensibilisation (Mott et al., 2010). De même dans un rKA GluK1-K3/GluK5, les sous-unités GluK5 jouent un rôle central dans l'activation du récepteur (Fisher et al., 2011). En raison de leur forte affinité pour le glutamate, elles sont activées en premier, amenant le récepteur dans un état activé non-désensibilisé. La désensibilisation

rapide n'intervient que lorsque les sous-unités de plus faible affinité, GluK1 (ou GluK2, GluK3) sont à leur tour activées par le glutamate. Les auteurs suggèrent ainsi que les sous-unités GluK1-K3 d'une part et GluK5 d'autre part contribuent différemment aux propriétés fonctionnelles du récepteur. D'après l'arrangement au niveau des NTDs, et si le domaine swapping décrit pour les rAMPA existe aussi pour les rKAs, alors, au niveau des ABDs, les sous-unités proximales (paire A/C) devraient être GluK5 et les sous-unités distales (paire B/D) GluK2, chaque paire de sous-unité ayant une contribution propre et distincte au contrôle de l'activité du canal ionique

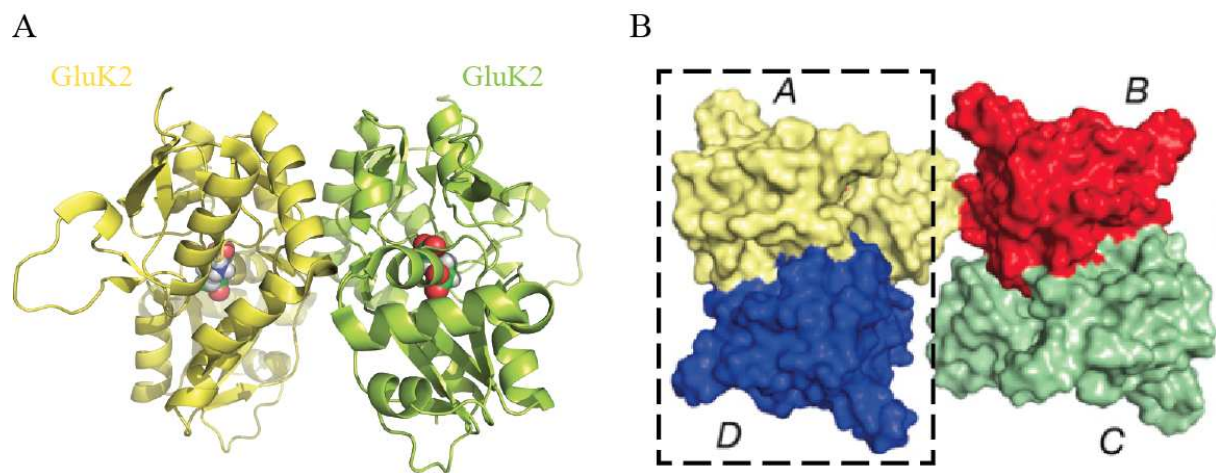


Figure 1.12. les récepteurs Kainate s'assemblent aussi en dimères de dimères. A- Structure cristallographique de l'homodimère d'ABDs de rKAs GluK2 (pdb 3G3F, 1.38 Å), complexé avec le glutamate (représenté par des sphères). B- Modèle d'un tétramère d'ABDs GluK2 d'un récepteur kainate, par homologie avec l'homotétramère rAMPA-GluA2. Le tétramère d'ABDs s'organise en dimère de dimères (l'un est encadré par des pointillés). D'après *Das et al., 2010*.

En conclusion, malgré l'absence de structures cristallographiques de rNMDA et rKA entiers, de nombreuses études structurales et fonctionnelles suggèrent que les sous-unités d'un iGluR, quel qu'il soit, s'arrangent de manière asymétrique (quatre sous-unités formant 2 paires de conformation distinctes) et que cette asymétrie explique les contributions différentes de chaque sous-unité à l'activité du récepteur.

2. INCORPORATION D'ACIDES AMINES NON-NATURELS DANS LES RECEPTEURS NMDA : IMPLEMENTATION ET APPLICATION POUR L'ETUDE DES INTERFACES ENTRE SOUS-UNITES ET DE LEUR DYNAMIQUE

2.1. Incorporation d'acides aminés non-naturels génétiquement encodés dans les récepteurs NMDA exprimés en ovocytes de *Xénopes*

2.1.1. Contexte de l'étude

Une des méthodes classiquement utilisées pour étudier les relations structure-fonction des récepteurs-canaux, lorsque nous ne disposons pas de structure cristallographique du récepteur, consiste à introduire dans la protéine des cystéines sélectionnées à partir d'un modèle structural et d'en étudier le pontage (Careaga & Falke, 1992). Cette approche permet notamment d'évaluer la proximité de deux sous-unités adjacentes (Krovetz et al., 1997) et d'étudier les répercussions fonctionnelles et structurales des contraintes exercées sur le récepteur. Dans les années 90, la chimie unique du groupe sulfhydrile (-SH) a suscité un vif intérêt avec le développement de la méthode SCAM (Substituted-Cysteine Accessibility Method). La SCAM est une approche qui permet d'évaluer l'environnement d'un acide-aminé en le mutant en cystéine et en étudiant la réactivité de cette dernière vis à vis d'agents chimiques qui réagissent spécifiquement avec le groupe sulfhydrile des cystéines (Karin & Akabas, 1998). Parmi ces réactifs, les plus utilisés sont les composés methanethiosulphonates (MTS), très appréciés pour leur petite taille et leur spécificité. L'approche SCAM a été utilisée depuis le début des années 90 pour caractériser les canaux ioniques et plus précisément : identifier les résidus longeant un canal, évaluer le diamètre du canal, estimer le potentiel électrostatique à l'intérieur du canal, déterminer les différences structurales dans différents états fonctionnels du canal, localiser les portes d'activation et les filtres de sélectivité, trouver des sites de liaison de bloqueurs du canal, etc (Javitch, 1998). Cette approche a été largement

utilisée pour étudier les canaux ioniques (Akabas et al., 1992 et 1994 ; Karlin & Akabas, 1998) mais aussi les sites de liaisons (Stauffer & Karlin, 1994 ; Javitch et al., 1994) de récepteurs membranaires du SNC (récepteurs couplés aux protéines G, récepteurs nicotiques à acétylcholine, récepteurs dopaminergiques, entre autres).

La technique de transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET) fournit également des informations sur la structure et la dynamique d'un récepteur. Le transfert d'énergie intermoléculaire permet d'étudier des interactions protéine-protéine, tandis que le transfert d'énergie intramoléculaire permet d'analyser les changements conformationnels intervenant au sein d'une protéine (Truong & Ikura, 2001). Découvert en 1948 par Förster (Förster, 1948 ; Lakowicz, 1999), le principe du FRET n'a été appliqué à des macromolécules biologiques que dans les années 70, afin de sonder la proximité entre deux régions protéiques (Uster & Pagano, 1986). Le FRET intramoléculaire est basé sur l'incorporation de fluorophores donneurs et accepteurs à différentes positions de la protéine d'intérêt. Les points d'insertion sont choisis de manière à ce que les changements conformationnels, en modifiant la distance et/ou l'orientation des fluorophores, entraînent des modifications du transfert d'énergie (augmentation ou diminution), du donneur vers l'accepteur. Ce transfert ne peut avoir lieu que si les fluorophores sont distants de moins de 10 nm. Les changements des valeurs de FRET permettent ainsi de suivre les dynamiques moléculaires à l'échelle de la milliseconde et fournissent, dans le cas des récepteurs-canaux, des informations essentielles sur les dynamiques conformationnelles au cours de l'activation, de la désensibilisation, etc. Cette approche, qui révèle des informations spatiales et temporelles sur la structure des protéines, est complémentaire des techniques de cristallographie aux rayons X ou de spectroscopie RMN qui, quant à elles, déterminent la structure tridimensionnelle de ces protéines biologiques.

Citons également les techniques de spectrométrie de masse, qui fournit des indications structurales importantes; de simulations de dynamiques moléculaires, qui donnent des renseignements, non seulement sur la structure d'un récepteur, mais surtout sur sa dynamique conformationnelle; de microscopie à force atomique (voir Résultats **1.3.3**), qui fournit des informations sur l'organisation et la stœchiométrie des récepteurs (Balasuriya et al., 2013) ; etc.

Une nouvelle technique de plus en plus répandue, permettant d'étudier à la fois la structure, les dynamiques conformationnelles et les relations structure-fonction d'une protéine, consiste à introduire par mutagenèse un acide-aminé non-naturel ("Unnatural Amino-Acid" ou UAA) à un site particulier d'une protéine. Cette approche permet d'introduire dans la protéine d'intérêt une nouvelle fonction chimique, absente naturellement, dont la réactivité permet une multitude d'applications (Reddington et al., 2013). En effet, selon leur nature, les UAAs peuvent être photo-réactifs (études d'interactions protéine-protéine et protéine-ligand) ou photocagés (contrôle de l'état d'activation d'une protéine), aider à la conjugaison de fluorophores ou être eux-mêmes fluorescents (détection de changements conformationnels), etc (voir Introduction 4.2). Cette méthode implique l'insertion d'un codon-stop (généralement de codon ambre) dans la protéine étudiée et sa lecture par un ARNt-suppresseur chargé avec l'UAA d'intérêt (voir Introduction 4). Jusqu'au début des années 2000, cet ARNt aminoacylé devait être synthétisé puis introduit dans la cellule (voir Introduction 4.1.1). Cette méthode, fastidieuse et au rendement relativement faible, a longtemps limité l'utilisation des UAAs. Désormais, l'expression directe dans le système choisi de la paire orthogonale {ARNt-suppresseur et aminoacyl-ARNt synthétase (aaRS)} permet de s'affranchir de ce problème majeur puisque la synthétase est capable d'aminocycler in situ (i.e. directement dans la cellule) l'ARNt-suppresseur, avec un UAA spécifiquement reconnu comme substrat par l'enzyme (voir Introduction 4.1.2). Cette approche, dite d'expansion du code génétique, ne nécessite aucune synthèse chimique, si ce n'est celle de l'UAA, qui est ensuite intégré au milieu de culture/d'incubation. Elle permet en outre de multiples recharges de l'ARNt et son amplification au fur et à mesure de la traduction protéique, contrairement à l'approche chimique pour laquelle l'ARNt, consommé de façon stœchiométrique lors de la synthèse de la protéine d'intérêt, s'épuise progressivement. L'incorporation d'UAAs par expansion du code génétique a été développée dans divers organismes et types cellulaires, dont la levure, les cellules de mammifère, les cellules couches neuronales, les cellules d'insecte, et des organismes multicellulaires invertébrés. Cependant, les exigences de la méthode, notamment la nécessité d'obtenir des paires {aaRS/ARNt-suppresseur} strictement orthogonales (c'est-à-dire n'interférant pas avec la machinerie endogène de traduction), freinent son développement.

Suite à l'arrivée de Shixin Ye dans notre équipe, en 2010, nous avons décidé d'explorer cette nouvelle approche et de l'appliquer à l'étude des récepteurs NMDA (rNMDA). Dans le

laboratoire, nous utilisons, pour nos expériences d'électrophysiologie et de biochimie, les ovocytes de *Xénope*, système classique d'expression des canaux et récepteurs-canaux. Afin de pouvoir exploiter cette technique innovante d'expansion du code génétique, il était donc essentiel que nous établissions, dans un premier temps, sa faisabilité dans les ovocytes de *Xénope*. L'ovocyte présente des avantages pour l'incorporation d'UAAs car il se caractérise par sa très grande taille, qui permet de micro-injecter directement le matériel génétique dans le noyau de la cellule, sans avoir besoin de réaliser des transfections d'ADN plasmidique.

Dans cet article publié en 2012 (Ye et al., 2013), nous avons donc étudié la possibilité d'appliquer le concept d'expansion du code génétique aux ovocytes. L'objectif de notre travail était de vérifier que la co-injection, dans un ovocyte de *Xénope*, d'un ARNt-suppresseur dérivé du *Bacillus stearothermophilus*, de l'enzyme synthétase correspondante, dérivée de *E.coli*, et des ADNc des sous-unités du rNMDA, dont l'une possède le codon-stop ambre introduit à une position spécifique, aboutissait à l'expression de récepteurs entiers, membranaires et fonctionnels, lorsque les ovocytes sont incubés, après injection, avec l'UAA d'intérêt, en l'occurrence des analogues de la tyrosine, le *p*-azido-*L*-phenylalanine (AzF) ou le *p*-benzoyl-*L*-phenylalanine (Bpa).

2.1.2. Article 2

Expanding the Genetic Code in *Xenopus laevis* Oocytes

Shixin Ye ^{a,b,c,*}, Morgane Riou ^{a,b,c}, Stéphanie Carvalho ^{a,b,c} and Pierre Paoletti ^{a,b,c,*}.

a. Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS, Paris, France

b. Inserm, U1024, Paris, France

c. CNRS, UMR 8197, Paris, France

* corresponding author : pierre.paoletti@ens.fr and yelehman@biologie.ens.fr



DOI: 10.1002/cbic.201200515

Expanding the Genetic Code in *Xenopus laevis* Oocytes

Shixin Ye,^{*,[a, b, c]} Morgane Riou,^[a, b, c] Stéphanie Carvalho,^[a, b, c] and Pierre Paoletti^{*,[a, b, c]}

Heterologous expression of ligand-gated ion channels (LGICs) in *Xenopus laevis* oocytes combined with site-directed mutagenesis has been demonstrated to be a powerful approach to study structure–function relationships. In particular, introducing unnatural amino acids (UAAs) has enabled modifications that are not found in natural proteins. However, the current strategy relies on the technically demanding in vitro synthesis of aminoacylated suppressor tRNA. We report here a general

method that circumvents this limitation by utilizing orthogonal aminoacyl-tRNA synthetase (aaRS)/suppressor tRNA_{CUA} pairs to genetically encode UAAs in *Xenopus* oocytes. We show that UAAs inserted in the N-terminal domain of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) serve as photo-crosslinkers that lock the receptor in a discrete conformational state in response to UV photo treatment. Our method should be generally applicable to studies of other LGICs in *Xenopus* oocytes.

Introduction

Ligand-gated ion channels (LGICs) have always attracted much attention, as they are keys mediators of intercellular communication. In the nervous system, LGICs mediate fast synaptic transmission.^[1] Despite recent progress, the molecular architecture and conformational changes associated with many LGICs remain poorly resolved because of the lack of sensitive structural techniques. The introduction of unnatural amino acids (UAAs) at specific sites in LGICs heterologously expressed in *Xenopus laevis* oocytes, along with the high sensitivity and resolution of cellular electrophysiological techniques, has been demonstrated to be a powerful approach for structure–function studies of these important proteins.^[2] This methodology involves the insertion of an amber stop codon within a target mRNA and read-through of the stop codon by a suppressor tRNA aminoacylated with the UAA of interest. The aminoacylated suppressor tRNA is generated by multiple-step synthesis^[3] and delivered into oocytes by microinjection.^[4] A significant limiting factor inherent to this approach is deacylation of the suppressor tRNA, which it is not continuously recharged with the desired UAA.^[5] Moreover, the challenging chemical synthesis of the aminoacylated tRNA has further prevented the approach from becoming widely used.

A possible improvement is the expression of an orthogonal synthetase/suppressor tRNA pair directly in the *Xenopus* oocyte. Genetic code expansion implementing engineered

aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) with altered amino acid specificity and its orthogonal suppressor tRNA pairs provides the ability to recycle the tRNA by specific reacylation with a UAA.^[6a] This approach takes advantage of aaRS/suppressor tRNA pairs that do not cross-react with endogenous tRNA or aaRS, and aminoacylate the suppressor tRNA in situ. To date, aaRS/suppressor tRNA pairs have been developed for UAA incorporation in *Escherichia coli*,^[6a] bacterial pathogens,^[6b] yeast,^[7a,b] mammalian^[8a-d] and insect cells,^[9] and recently even in the multicellular organisms *Caenorhabditis elegans*^[10a,b] and *Drosophila melanogaster*.^[11] However, to the best of our knowledge, there are no reports of engineered aaRS/suppressor tRNA pairs designed for UAA mutagenesis in *Xenopus* oocytes.^[12] Here we report a genetic code expansion in *X. laevis* oocytes by using aaRS/suppressor tRNA_{CUA} pairs previously developed for mammalian cells.

To develop our strategy, we faced the challenge of genetically encoding a suppressor tRNA that would be correctly processed and specifically aminoacylated by the engineered aaRS in oocytes. The conservation of the split tRNA promoters of *X. laevis* and all eukaryotic tRNA genes^[13] was promising for the development of our strategy. We hypothesized that suppressor tRNAs designed for genetic code expansion in mammalian cells could be directly used in oocytes.


Results and discussions

To test the feasibility of encoding the Yam suppressor tRNA^[8c] (a suppressor tRNA derived from *Bacillus stearothermophilus* and responsive to the amber stop codon) in oocytes, a “wild-type recovery” experiment was performed on N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs). NMDARs are glutamate-gated ion channels that are widespread in the brain, control excitatory synaptic transmission and synaptic plasticity, and are associated with learning and memory.^[14] Functional NMDARs requires coexpression of GluN1 and GluN2 subunits^[14] (Figure 1A). We mutated the GluN2B (subtype of GluN2) gene to replace the

[a] Dr. S. Ye, M. Riou, S. Carvalho, Dr. P. Paoletti
Ecole Normale Supérieure, Institut de Biologie de l'ENS, IBENS
46 rue d'Ulm, Paris 75005 (France)
E-mail: yelehman@biologie.ens.fr
pierre.paoletti@ens.fr

[b] Dr. S. Ye, M. Riou, S. Carvalho, Dr. P. Paoletti
Inserm, U1024
46 rue d'Ulm, Paris 75005 (France)

[c] Dr. S. Ye, M. Riou, S. Carvalho, Dr. P. Paoletti
CNRS, UMR8197
46 rue d'Ulm, Paris 75005 (France)

 Supporting information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201200515>.

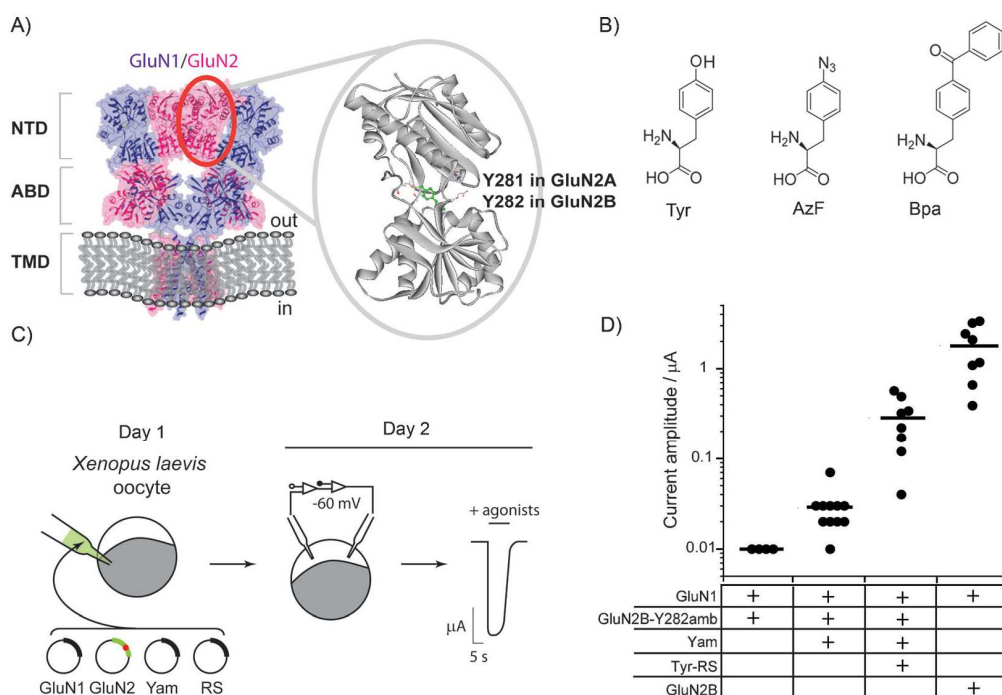


Figure 1. Genetically encoding photoactive tyrosine analogues in *X. laevis* oocytes. **A)** Molecular architecture of ionotropic glutamate receptor showing positions subjected to incorporation of unnatural amino acids (UAAs). Layer organization of the full receptor as observed in the AMPA-sensitive GluA2 homotrimer crystal structure,^[29] showing the dimer-of-dimers organization in the extracellular region. NTD, N-terminal domain; ABD, agonist-binding domain, which binds glycine (or D-serine) in GluN1 (blue) and glutamate in GluN2 (pink) subunits; TMD, transmembrane domain, which comprises the ion-channel pore. The NTD in the GluN2 subunit is further expanded, with the Tyr281 position (in GluN2A; Tyr282 in GluN2B subtype) highlighted in green. Adapted from ref. [29]. **B)** Chemical structures of tyrosine (Tyr), *p*-azido-L-phenylalanine (AzF), and *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa). **C)** Schematic illustration of amber stop codon suppression in *Xenopus* oocytes. Oocytes were injected with a combination of four plasmids encoding the wt GluN1 subunit (GluN1), GluN2 containing an amber stop codon at a specific site (GluN2), suppressor tRNA (Yam), and an engineered tRNA synthetase (RS). The current responses to coagonists glutamate and glycine (Glu/Gly) at -60 mV were measured on the second day after co-injection. **D)** Analysis of current responses to coagonists ($100 \mu\text{M}$ Glu/Gly). Oocytes were injected with plasmids encoding GluN1, GluN2B (or GluN2B-Y282amb), Yam, and *E. coli* TyrRS. For each condition, 20 oocytes were tested. Currents $\geq 0.01 \mu\text{A}$ are plotted.

UAC codon of Tyr282 with an amber stop codon (UAG; Figure 1B, C). As expected, no NMDAR current was observed when GluN1 was co-injected with the mutated GluN2B (Figure 1D). In contrast, when the cDNAs of the Yam suppressor tRNA and its orthogonal *E. coli* Tyr-aminoacyl tRNA synthetase (TyrRS) were co-injected to enable specific aminoacylation (Figure 1D, lane 3), robust NMDAR responses were observed 24 h post injection, thus indicating expression of full-length functional NMDAR. The expression level was smaller ($\sim 15\%$) but comparable to that found with wild-type receptors. When TyrRS cDNA was absent, only tiny responses (< 100 nA) were detected (Figure 1D, lane 2).

The aminoacylation of Yam strictly depended upon co-injection of TyrRS when Yam was provided at low concentrations (Figure 2A). In the absence of *E. coli* TyrRS, however, as the concentration of Yam was increased, the signals for full-length receptors significantly increased, thus suggesting that the Yam suppressor tRNA can be aminoacylated by endogenous synthetases and thereby result in read-through of the amber stop codon. Strict control of the Yam concentration is thus required to avoid nonspecific recognition of Yam tRNA by endogenous synthetases.

Next, to demonstrate the encoding of UAAs, we tested two engineered synthetases (derived from *E. coli* TyrRS) that accept *p*-azido-L-phenylalanine (AzF)^[7a,15] and *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa)^[7a,8c] as substrates (Figures 1B and 2B, C). Both synthetases form orthogonal pairs with the Yam suppressor. We first aimed to find expression conditions for which Yam is aminoacylated with the orthogonal UAA by the corresponding synthetases, AzFRS or BpaRS. The level of aminoacylation was measured for a range of synthetase cDNA concentrations. For each condition, oocytes were cultured with or without UAAs in the media. As judged from NMDAR response amplitudes, reliable incorporation of AzF was achieved at AzFRS cDNA concentrations below $20 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (Figure 2B). When the AzFRS concentration was high, receptor expression was independent of the presence of AzF, thus indicating that AzFRS can use endogenous amino acids (likely tyrosine) as substrate. This leaky behavior was not observed in the case of BpaRS. Only in oocytes that had been maintained in the presence of Bpa (2 mM) were robust signals observed, thus confirming specific incorporation of Bpa into the receptor (Figure 2C).

To provide further evidence for the incorporation of the UAAs into the receptors, we performed immunoblotting ex-

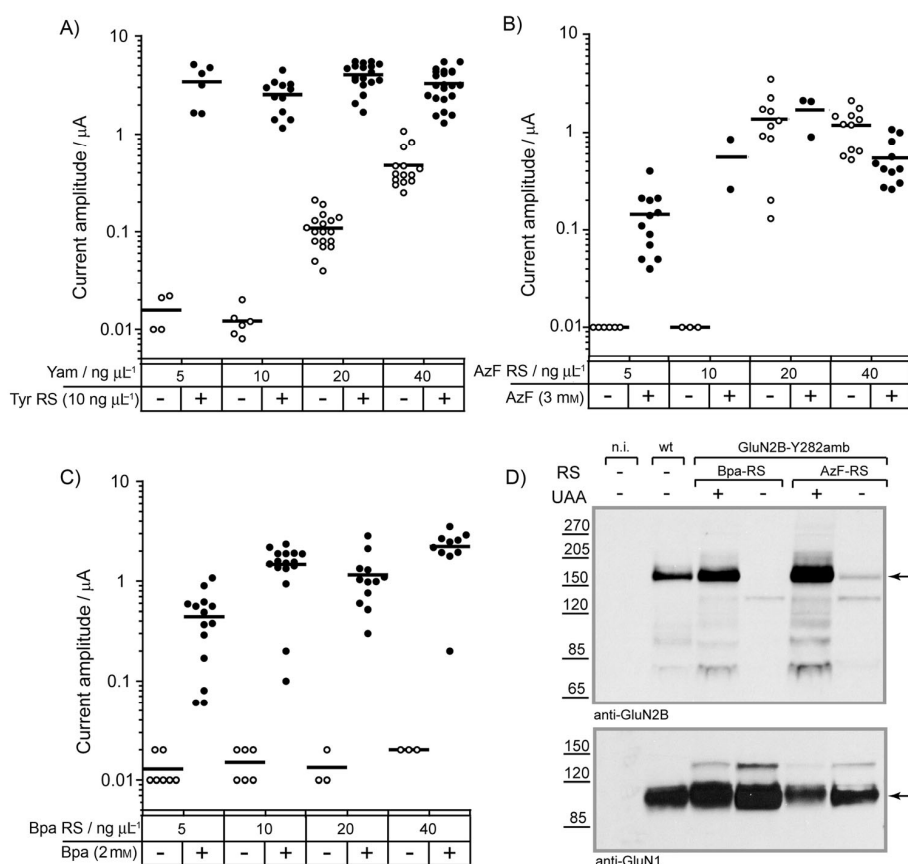


Figure 2. Optimizing the cDNA dosages of the suppressor tRNA and synthetases. A) Representative dot plot of the current amplitudes from oocytes injected with plasmids carrying genes for GluN1 (60 ng μL^{-1}), GluN2B-Y282amb (60 ng μL^{-1}), and Yam suppressor tRNA (various cDNA concentrations), in the absence (\circ) or presence (\bullet) of *E. coli* TyrRS (10 ng μL^{-1}). B) Representative dot plot of current amplitudes from oocytes injected with plasmids carrying genes for GluN1 (60 ng μL^{-1}), GluN2B-Y282amb (60 ng μL^{-1}), Yam suppressor tRNA (10 ng μL^{-1}), and AzFRS (various cDNA concentrations), in the absence (\circ) or presence (\bullet) of AzF in the incubation medium. C) Representative dot plot of current amplitudes from oocytes injected with plasmids carrying genes for GluN1 (60 ng μL^{-1}), GluN2B with an amber mutation (60 ng μL^{-1}), Yam suppressor tRNA (10 ng μL^{-1}), and BpaRS (various cDNA concentrations), in the absence (\circ) or presence (\bullet) of Bpa. For each plot, 20 oocytes were tested; current amplitudes ≥ 0.01 μA are plotted as dots (non-overlapping). D) Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wt or mutant GluN2B receptors. Noninjected oocytes (n.i.), or oocytes injected with wt GluN1/GluN2B subunits (wt), or with wt GluN1 and mutant (amber codon at Y282 position; GluN2B-Y282amb) were subjected to PAGE and subsequently transferred and tested with antibodies against GluN2B (upper panel) or GluN1 (lower panel). For all the GluN2B-Y282amb conditions, oocytes were co-injected with Yam and BpaRS or AzFRS, and incubated in the absence (-) or presence (+) of 2 mM Bpa or AzF in Barth medium. Arrows indicate the expected band positions of GluN2B (170 kDa) and GluN1 (110 kDa) monomers. Lower molecular bands were observed for anti-GluN2B detection due to minor degradation of GluN2B, which varied between batches of oocytes.

periments. We tested UAA incorporation by detecting the presence of full-length GluN2B with an anti-GluN2B specific antibody. When amber-mutated receptors were injected with BpaRS or AzFRS (Figure 2D), full-length GluN2B subunits were strongly expressed (comparable to the level observed for wild-type) when the UAA was supplemented, whereas little or no expression was detected without UAAs. When comparing BpaRS and AzFRS, we noticed that minor read-through occurred for the AzFRS (the presence of a faint band in the -UAA lane), but not for the BpaRS. This agrees well with our functional results (Figure 2B, C), which showed that BpaRS is less reactive than AzFRS towards endogenous amino acids.

We next evaluated the functional changes resulting from incorporation of UAAs at position Y282 in GluN2B, and the homologous site in GluN2A (Y281). This position is in the hinge region of the N-terminal domain (NTD), a large clamshell-like domain that has a critical role both on receptor intrinsic activity (channel-open probability) and sensitivity to allosteric modulators such as Zn^{2+} ions.^[16] Incorporation of AzF and Bpa into GluN2A had no effect on channel-open probability, as assessed by the inhibition kinetics of the open-channel blocker MK-801, while Zn^{2+} sensitivity was slightly reduced with Bpa (but not with AzF; see (Figure S1 in the Supporting Information)). With GluN2B, clear alterations in both channel activity and zinc sensitivity were observed. Zn^{2+} IC_{50} increased two- and threefold with the AzF and Bpa mutants, respectively (Figure 3A), and changes in channel-open probability followed a similar trend, with the Bpa mutant showing a stronger modification (decrease in channel activity) than AzF (Figure 3B). Noticeably, for both GluN2A and GluN2B, suppressed wild-type (amber codon introduced; suppressed with endogenous amino acid (Tyr)) and wild-type receptors displayed indistinguishable properties, thus further confirming that the amber suppression procedure per se does not cause functional changes in the receptors.^[3,4] The functional changes in the

GluN2B receptors (and to some extent GluN2A), confirm that the UAA is indeed incorporated into the receptor.

We also tested for potential alterations to receptor function caused by the presence of mutant *E. coli* synthetases and UAAs, by assaying glutamate binding sensitivity. If *E. coli* synthetases cross-react with the host tRNAs at a significant levels (most likely endogenous Tyr-tRNAs), AzF or Bpa will be introduced in place of Tyr. As previously shown, the glutamate-binding site in the GluN2B subunit has a key tyrosine (Tyr705), which makes critical contact with the glutamate.^[17] When mutated to Ala, there is a greater than 400 times decrease in the binding affinity (increase in glutamate EC_{50}). We therefore co-

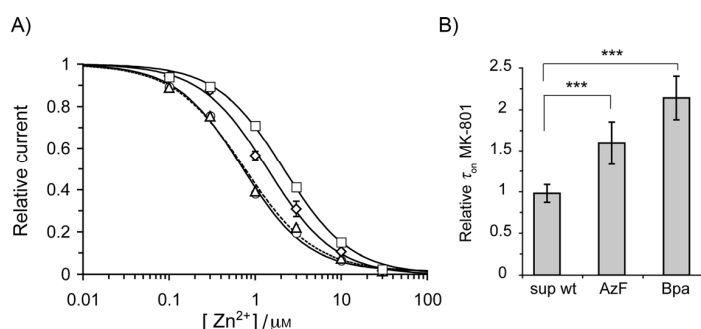


Figure 3. Incorporation of AzF and Bpa into NMDARs. A) Zn^{2+} dose–response curves for receptors containing wt GluN1/GluN2B (\circ : $IC_{50} = (0.74 \pm 0.09) \mu M$, $n_H = 1.07$, $n = 6$), suppressed wt GluN1/GluN2B-Y282amb (\triangle : $IC_{50} = (0.71 \pm 0.07) \mu M$, $n_H = 1.14$, $n = 10$), and GluN1/GluN2B-Y282amb with AzF (\diamond : $IC_{50} = (1.4 \pm 0.1) \mu M$, $n_H = 1.12$, $n = 7$) or Bpa (\square : $IC_{50} = (2.5 \pm 0.2) \mu M$, $n_H = 1.02$, $n = 6$). B) MK-801 (50 nM) inhibition kinetics for GluN2B incorporated with AzF or Bpa at Y282: suppressed wt (0.9 ± 0.1 , $n = 13$), GluN2B-Y282AzF (1.5 ± 0.2 , $n = 8$) and GluN2B-Y282Bpa (2.9 ± 0.2 , $n = 11$). “Suppressed wt” refers to receptors generated by the amber codon suppression and recovered with the native (wt) amino acid, Tyr.

injected oocytes with mutant synthetases together with cDNAs encoding wild-type GluN1 and GluN2B. Oocytes were incubated in medium supplemented with the corresponding UAA. No noticeable alteration was observed in glutamate sensitivity (Figure S2A). In addition, no changes were observed in MK-801 kinetic assay (Figure S2B), thus suggesting that there was no significant amount of GluN2B with Tyr replaced with a UAA.

Upon excitation in the near UV, both AzF and Bpa can generate radical species and subsequently react with protein side chains in the close vicinity^[18] (Figure 4A). To investigate the feasibility of UV-induced crosslinking in NMDARs incorporating AzF or Bpa, we compared receptor properties before and after UV exposure (Figure S3, Figure 4B and C). Oocytes were incubated on ice and subjected to UV (360 nm) for 30 min. Following UV exposure, cells were assayed for Zn^{2+} sensitivity (Figure 4B) and channel-open probability (Figure 4C). Oocytes ex-

pressing suppressed wild-type GluN2A and GluN2B receptors without the UAAs served as controls, and demonstrated no functional changes following UV treatment (Figure S4). We observed that, in the case of GluN2A incorporating AzF, Zn^{2+} sensitivity (measured as maximum inhibition) was significantly decreased following UV treatment (from $(77 \pm 1.4)\%$ to $(63 \pm 2.7)\%$; Figure 4B). The channel-open probability shifted towards decreased channel activity (Figure 4C). These data strongly suggest that the AzF side chains react with a nearby residue upon UV illumination (Figure 4A). The available structural data on NMDAR NTDs^[19] reveal that Y282 makes multiple contacts (within 3–4 Å) with neighboring residues. Although detailed structural information is lacking, the decreased zinc sensitivity following UV exposure, together with the decreased channel-open probability, fits well with a model in which the photo-crosslinked UAA favors a closed conformation of the NTD.^[16] Interestingly, no functional changes were observed for GluN2B (data not shown). This was not totally un-

expected given that the introduction of UAAs into GluN2B perturbed the function of the receptor, which implies a significant change in the position of Y282.

In conclusion, we have established that aaRS/tRNA suppressor pairs designed to incorporate UAAs in response to amber stop codons in mammalian cells could be adapted to UAA incorporation in *Xenopus* oocytes. By using NMDAR as a model LGIC, we demonstrated that the Yam suppressor tRNA can be genetically encoded, processed, and used to read through amber stop codons when Yam cDNA is injected at low concentration. For the two synthetase variants we tested (AzFRS/Yam and BpaRS/Yam), we have confirmed that both are orthogonal to the suppressor tRNA Yam, while having minimal reactivity toward endogenous tRNAs. In comparisons of reactivity to their corresponding UAAs, BpaRS/Yam was demonstrated to incorporate Bpa with higher translational fidelity than the

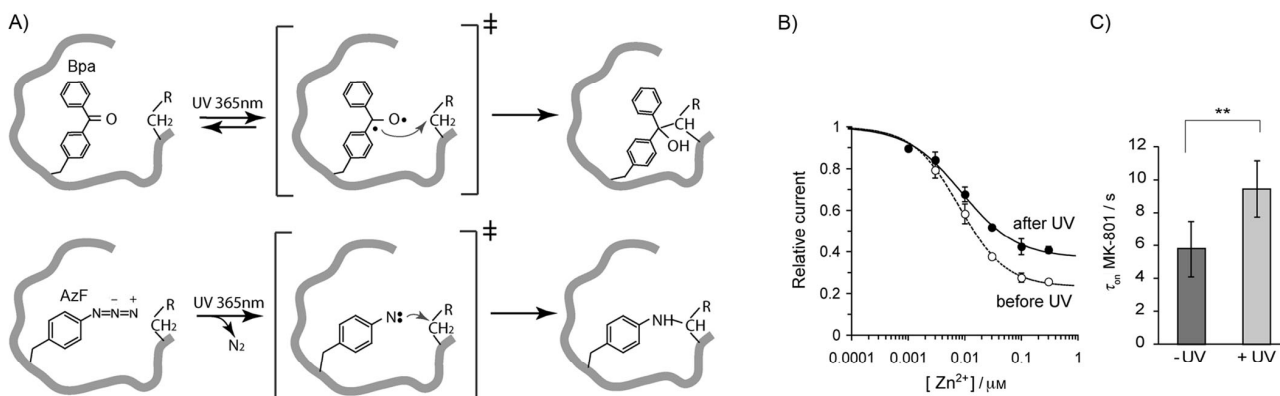


Figure 4. Bpa and AzF serve as photo-crosslinkers. A) When exposed to UV light, Bpa and AzF generate bi-radicals (intermediate states) and form covalent linkages with nearby side-chains. B) Zn^{2+} dose–response curves of GluN1/GluN2A-Y281AzF before (\circ : $IC_{50} = (8.0 \pm 0.5) nM$, $n_H = 1.06$, max inhibition = $(77 \pm 1.4)\%$, $n = 10$) and after (\bullet : $IC_{50} = (8.9 \pm 1.5) nM$, $n_H = 0.89$, max inhibition = $(63 \pm 2.7)\%$, $n = 18$) 30 min of UV exposure. Error bars represent standard deviation. C) MK-801 inhibition kinetics for GluN2A incorporated with AzF at Y281 before and after UV treatment. MK-801 was applied at 10 nM before (5.8 ± 1.7 s, $n = 5$) and after (9.4 ± 1.7 s, $n = 14$) 30 min exposure to UV.

AzFRS/Yam pair. In the case of AzFRS, the concentration of synthetase cDNA has to be strictly controlled to avoid read-through of the amber codon in the absence of AzF. Although potential problems associated with reduction of AzF have been reported,^[20] our experiments have not involved any reducing reagents (such as dithiothreitol, glutathione, or 2-mercapthanol), in order to avoid rapid reduction of aryl-azide to aryl-amine. Our experiments also suggest that the UAA, when added to the culture medium (at a few millimolar), can be spontaneously internalize into the oocyte cytoplasm and reach concentrations sufficient to allow effective charging of the tRNA.

A potential change of oocyte physiology due to the read-through of endogenous amber stop codons has been verified by Grosjean and co-workers.^[21] Their study demonstrated that only a minority of endogenous proteins are affected by the read-through of amber stop codons (<10%). However, our assays cannot distinguish nonspecific effects arising from the incorporation of UAAs into the whole proteome.

In comparison to the semisynthetic approach, which allows the incorporation of a wide variety of UAAs,^[2–4] the aaRS/suppressor tRNA pair strategy has significantly enhanced technical convenience. However, the latter strategy requires the engineering of an orthogonal synthetase for each UAA. Besides the about ten synthetase pairs developed for UAA incorporation in mammalian cells,^[6,22] the recent demonstration of transforming existing archeal tyrosyl-tRNA synthetases for UAA incorporation into mammalian cells has the potential to provide an additional array of 40 UAAs for genetic code expansion in oocytes.^[23] We also anticipate alternative methods^[24] to re-engineer existing synthetases to achieve higher selectivity.

Our results for incorporating tyrosine analogues at an interlobe position in the GluN2 NTD reinforce the importance of this distal hinge region in controlling NMDAR gating and pharmacological properties.^[14a,16] These benzophenone and azido moieties are widely used to photo-crosslink macromolecules and are useful for probing protein–ligand^[18a,b] and protein–protein interactions.^[18c] In comparison to other cellular organisms (*E. coli*, insect and mammalian cells), *Xenopus* oocytes represent a superior system for functional assays because of their tolerance to and stability after UV treatment. This mutagenesis approach has the potential to be extended to using UAAs as bio-orthogonal chemical handles in the fluorescent labeling of membrane proteins.^[25] Furthermore, it might be possible for this to be adapted to other aaRS/suppressor tRNA pairs, such as for the introduction of photocaged amino acids^[2,26] for the engineering of LGICs controlled by light.

Experimental Section

Materials: *p*-azido-L-phenylalanine (AzF) and *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) were purchased from Chem-Impex International (Wood Dale, IL) and Bachem (Bubendorf, Switzerland), respectively. HEPES, L-glutamate, glycine, DTPA, and tricine were obtained from Sigma-Aldrich. D-APV and (+)-MK-801 were purchased from Ascent Scientific (Bristol, UK).

Plasmids and site-directed mutagenesis: Plasmid pSVB.Yam carrying the gene encoding the amber suppressor tRNA was derived from *B. stearothermophilus* Tyr-tRNA_{CUA} and has been described previously.^[8c] The aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) for AzF and Bpa were constructed as previously described.^[8c,15a] The pcDNA3-based expression plasmids for rat GluN1-1a, rat GluN2A, and mouse GluN2B have been described previously.^[27a,b] The amber mutations were introduced into GluN2A and GluN2B by using a Quikchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene).

Injection of plasmid DNAs into oocytes and UAA incubation: Oocytes were prepared as previously described.^[27c] They were injected (total volume 36 nL) with a mixture of cDNAs encoding GluN1 and GluN2 (10 ng μL^{-1} (wt GluN2A) and 30 ng μL^{-1} (wt GluN2B)) at 1:1 (v/v) ratio. For UAA incorporation, oocytes were co-injected (total volume 36 nL) with a mixture of cDNAs containing GluN1, GluN2, Yam, and aaRS as follows, unless otherwise indicated in the text: wt GluN1 (20 ng μL^{-1}), GluN2A-Y281amb (20 ng μL^{-1}), Yam (5 ng μL^{-1}), and BpaRS (5 ng μL^{-1}) or AzFRS (1 ng μL^{-1}); or wt GluN1 (60 ng μL^{-1}), GluN2A-Y282amb (60 ng μL^{-1}), Yam (10 ng μL^{-1}), and BpaRS (10 ng μL^{-1}) or AzFRS (2 ng μL^{-1}). After injection, oocytes were incubated at 18 °C in Barth solution (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM Ca(NO₃)₂, 0.41 mM CaCl₂, 0.82 mM MgSO₄, 2.4 mM NaHCO₃, 10 mM HEPES, pH adjusted to 7.6 with NaOH) supplemented with gentamicin sulfate (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and NMDAR antagonist D-APV (D-[–]-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, 50 μM) to prevent NMDAR-induced cell toxicity. AzF was dissolved with sonication in Barth solution (stock: 10 mM), and diluted (3 mM) for oocytes incubation. Bpa was dissolved in ddH₂O (stock: 260 mM) by adding equal molar of NaOH, and subsequently diluted (2 mM) in Barth solution.

Electrophysiology: For all experiments, the standard external solutions contained: NaCl (100 mM), BaCl₂ (300 μM), and HEPES (5 mM, pH 7.3 (with KOH)). Other than for the glutamate sensitivity assay (100 μM glycine in the presence of various concentrations of L-glutamate), NMDAR-mediated currents were induced by applying L-glutamate (100 μM) and glycine (100 μM ; Glu/Gly), which activate the receptors at the maximum level. Currents were recorded and measured at a holding potential of –60 mV at room temperature. In the Zn²⁺ sensitivity experiments, for free Zn²⁺ concentrations from 1 nM to 1 μM , tricine (N-tris[hydroxymethyl]methylglycine, 10 mM) was used to buffer Zn²⁺, and the following relationship was used to calculate the free Zn²⁺ concentrations: $[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}} = [\text{Zn}^{2+}]_{\text{added}}/200$ as previously described.^[27a,c,d] For concentrations above 1 μM , Zn²⁺ was not buffered. In all zero-Zn²⁺ control solutions (with or without tricine), diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA, 10 μM) was added to chelate trace Zn²⁺ and other heavy metals.^[27c] Data collection and analysis of Zn²⁺ dose–response curves were performed as described.^[17] The curves represent least-squares fits to the data points with the Hill equation $I/I_{\text{max}} = 1 - a/(1 + IC_{50}/[\text{Zn}^{2+}]^{n_H})$, where I/I_{max} is the relative current at the maximal level of inhibition, and n_H is the Hill coefficient. Error bars represent standard deviation. Experiments with MK-801 were performed as described previously.^[28a] MK-801 solutions (10–50 nM) were prepared by dilution of stock solution (50 mM) into agonist-containing solution. MK-801 time constants of inhibition (τ_{on}) were obtained by fitting currents with a single-exponential component to a time window corresponding to 10–90% of maximum inhibition. Each τ_{on} was then normalized to the mean τ_{on} of wt receptors measured the same day.

Immunoblotting: Sample preparation, nonreducing SDS-PAGE, and immunoblotting were performed as described.^[28] In brief, for each condition, oocytes were cultured for three days post injection.

tion, to achieve maximal protein expression (NMDAR-mediated currents > 10 μ A). Each batch of two oocytes was then homogenized and processed, and then separated in nonreducing conditions on SDS-PAGE gradient gels (3–8%), and dry transferred as described.^[28] The following antibodies were used: anti-GluN1 (1:1000, mouse monoclonal MAB1586 clone 54.1; Millipore, Billerica, MA) and anti-GluN2B antibody (1:500, mouse monoclonal 610416 clone 13; BD Transduction Laboratories). Protein bands were visualized by using secondary goat peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:20 000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) with SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). Nonspecific bands (i.e., immunoblot experiments with non-injected oocytes), were regularly monitored with anti-GluN1 antibody. (The intensity of this bands varied from one batch of oocytes to another.)

Photo treatment: Oocytes expressing wt NMDA receptors or AzF or Bpa mutant receptors were transferred to a 96-well plate containing Barth solution free of UAAs (one oocyte per well, animal pole facing up), on ice. Cells were irradiated (365 nm) for 30 min with a hand-held VL-6LC UV lamp (6 W, Viber Lourmat, Marne-la-Vallée, France) placed on top of the plate. After UV treatment, cells were subject to assays.

Acknowledgements

We thank Prof. Thomas P. Sakmar at the Rockefeller University for providing suppressor tRNA and engineered synthetase plasmids. Financial support was made available by the Foundation Pierre-Gilles-de-Genes (Fellowship to S.Y.) and the Foundation pour le Recherche Médicale (FRM, "Equipe FRM" grant to P.P.). We also thank Pamela Rodriguez and Arnaud Gautier for critical review of the manuscript.

Keywords: genetic code · ion channels · photochemistry · unnatural amino acids · *Xenopus laevis* oocytes

- [1] T. G. Smart, P. Paoletti, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2012**, *4*, a009662.
- [2] D. A. Dougherty, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2000**, *4*, 645.
- [3] C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith, P. G. Schultz, *Science* **1989**, *244*, 182.
- [4] a) M. W. Nowak, P. C. Keamey, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty, H. A. Lester, *Science* **1995**, *268*, 439; b) K. A. McMenimen, E. J. Petersson, H. A. Lester, D. A. Dougherty, *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 227.
- [5] a) R. P. Martin, A.-P. Sibling, G. Dirheimer, S. de Henau, H. Grosjean, *Nature* **1981**, *293*, 235; b) A. M. Shafer, T. Kálai, S. Q. B. Liu, K. Hideg, J. C. Voss, *Biochemistry* **2004**, *43*, 8470.
- [6] a) L. Wang, A. Brock, B. Herberich, P. G. Schultz, *Science* **2001**, *292*, 498; b) S. Lin, Z. Zhang, H. Xu, L. Li, S. Chen, J. Li, Z. Hao, P. R. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20581.
- [7] a) J. W. Chin, T. A. Cropp, J. C. Anderson, M. Mukherji, Z. Zhang, P. G. Schultz, *Science* **2003**, *301*, 964; b) T. S. Young, I. Ahmad, A. Brock, P. G. Schultz, *Biochemistry* **2009**, *48*, 2643.
- [8] a) K. Sakamoto, A. Hayashi, A. Sakamoto, D. Kiga, H. Nakayama, A. Soma, T. Kobayashi, M. Kitabatake, K. Takio, K. Saito, M. Shirouzu, I. Hirao, S. Yokoyama, *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 4692; b) W. Wang, J. K. Takimoto, G. V. Louie, T. J. Baiga, J. P. Noel, K.-F. Lee, P. A. Slesinger, L. Wang, *Nat. Neurosci.* **2007**, *10*, 1063; c) S. Ye, C. Köhrer, T. Huber, M. Kazmi, P. Sachdev, E. C. Y. Yan, A. Bhagat, U. L. Rajbhandary, T. P. Sakmar, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1525; d) B. Shen, Z. Xiang, B. Miller, G. Louie, W. Wang, J. P. Noel, F. H. Gage, L. Wang, *Stem Cells* **2011**, *29*, 1231.
- [9] T. Mukai, M. Wakiyama, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Protein Sci.* **2010**, *19*, 440.
- [10] a) S. Greiss, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14196; b) A. R. Parrish, X. She, Z. Xiang, I. Coin, Z. Shen, S. P. Briggs, A. Dillin, L. Wang, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1292.
- [11] A. Bianco, F. M. Townsley, S. Greiss, K. Lang, J. W. Chin, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 748.
- [12] a) Q. Wang, A. R. Parrish, L. Wang, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 323; b) C. C. Liu, P. G. Schultz, *Annu. Rev. Biochem.* **2010**, *79*, 413; c) L. Davis, J. W. Chin, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 168; d) K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **2009**, *54*, 1454.
- [13] G. Galli, H. Hofstetter, M. L. Birnstiel, *Nature* **1981**, *294*, 626.
- [14] a) P. Paoletti, *Eur. J. Neurosci.* **2011**, *33*, 1351; b) S. F. Traynelis, L. P. Wollmuth, C. J. McBain, F. S. Menniti, K. M. Vance, K. K. Ogden, K. B. Hansen, H. Yuan, S. J. Myers, R. Dingledine, *Pharmacol. Rev.* **2010**, *62*, 405.
- [15] a) S. Ye, T. Huber, R. Vogel, T. P. Sakmar, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 397; b) S. Ye, E. Zaitseva, G. Caltabiano, G. F. Schertler, T. P. Sakmar, X. Deupi, R. Vogel, *Nature* **2010**, *464*, 1386.
- [16] a) M. Gielen, A. Le Goff, D. Stroebel, J. W. Johnson, J. Neyton, P. Paoletti, *Neuron* **2008**, *57*, 80; b) M. Gielen, B. Sieglar Retchless, L. Mony, J. W. Johnson, P. Paoletti, *Nature* **2009**, *459*, 703.
- [17] B. Laube, R. Schemm, H. Betz, *Neuropharmacology* **2004**, *47*, 994.
- [18] a) A. Grunbeck, T. Huber, P. Sachdev, T. P. Sakmar, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3411; b) I. Coin, M. H. Perrin, W. W. Vale, L. Wang, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 8227; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8077; c) N. Hino, Y. Okazaki, T. Kobayashi, A. Hayashi, K. Sakamoto, S. Yokoyama, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 201.
- [19] E. Karakas, N. Simorowski, H. Furukawa, *EMBO J.* **2009**, *28*, 3910.
- [20] a) J. V. Staros, H. Bayley, D. N. Standring, J. R. Knowles, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *80*, 568; b) S. Milles, S. Tyagi, N. Banterle, C. Koehler, V. VanDelinder, T. Plass, A. P. Neal, E. A. Lemke, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5187.
- [21] M. Bienz, E. Kubli, J. Kohli, S. deHenau, G. Huez, G. Marbaix, H. Grosjean, *Nucleic Acids Res.* **1981**, *9*, 3835.
- [22] A. Bormann, S. Milles, T. Plass, J. Dommerholt, J. M. M. Verkade, M. Wießler, C. Schultz, J. C. M. van Hest, F. L. van Delft, E. A. Lemke, *ChemBioChem* **2012**, *13*, 2094.
- [23] G. N. Thibodeaux, X. Liang, K. Moncivais, A. Umeda, O. Singer, L. Alfonta, Z. J. Zhang, *PLoS One* **2010**, *5*, e11263.
- [24] S. M. Kuhn, M. Rubini, M. Fuhrmann, I. Theobald, A. Skerra, *Mol. Biol.* **2010**, *404*, 70.
- [25] K. Lang, L. Davis, J. Torres-Kolbus, C. Chou, A. Deiters, J. W. Chin, *Nat. Chem.* **2012**, *4*, 298.
- [26] A. Gautier, D. P. Nguyen, H. Lusic, W. An, A. Deiters, J. W. Chin, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4086.
- [27] a) P. Paoletti, F. Perin-Dureau, A. Fayyazuddin, A. Le Goff, I. Callebaut, J. Neyton, *Neuron* **2000**, *28*, 911; b) J. Rachline, F. Perin-Dureau, A. Le Goff, J. Neyton, P. Paoletti, *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 308; c) P. Paoletti, P. Ascher, J. Neyton, *J. Neurosci.* **1997**, *17*, 5711; d) A. Fayyazuddin, A. Villarreal, A. Le Goff, J. Lerma, J. Neyton, *Neuron* **2000**, *25*, 683.
- [28] a) L. Mony, S. Zhu, S. Carvalho, P. Paoletti, *EMBO J.* **2011**, *30*, 3134; b) M. Riou, D. Stroebel, J. M. Edwardson, P. Paoletti, *PLoS One* **2012**, *7*, e35134.
- [29] A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, *Nature* **2009**, *462*, 745.

Received: August 9, 2012

Published online on January 4, 2013

2.1.3. Discussion

Nous démontrons dans cet article que les paires ARNt-suppresseur/aminoacyl-ARNt synthétase (notées ARNt/aaRS) conçues pour l'incorporation d'UAAs dans des cellules de mammifère sont adaptées à l'expansion du code génétique dans les ovocytes de *Xénope*. Par une approche combinant électrophysiologie et biochimie, nous avons montré que (1) la paire orthogonale ARNt/aaRS (avec aa = Tyr, Bpa ou AzF) est efficace pour lire et traduire le codon-stop ambre en acide-aminé (respectivement Tyr, Bpa ou AzF) ; (2) l'orthogonalité est respectée, en particulier, l'aaRS (avec aa = Bpa ou AzF) ne prend pas d'acide-aminé endogène (Tyr) comme substrat pour catalyser l'aminocyclation de l'ARNt (l'approche biochimique, par exemple pour le mutant GluN1-Y535amb, renforce cette assertion ; Fig. 2.1) ; (3) les sous-unités de rNDMA ayant incorporé l'UAA à la position choisie sont entières et intégrées dans des rNMDAs fonctionnels ; (4) le processus d'incorporation, en tant que tel, de l'UAA dans la chaîne protéique ne perturbe pas les fonctions de base du rNMDA (activation par le glutamate et la glycine) ; (5) la présence de l'UAA en lieu et place du résidu endogène affecte les propriétés fonctionnelles du rNMDA, ce qui laisse entrevoir le potentiel de cette incorporation d'UAA dans l'étude des relations structure-fonction des rNMDAs.

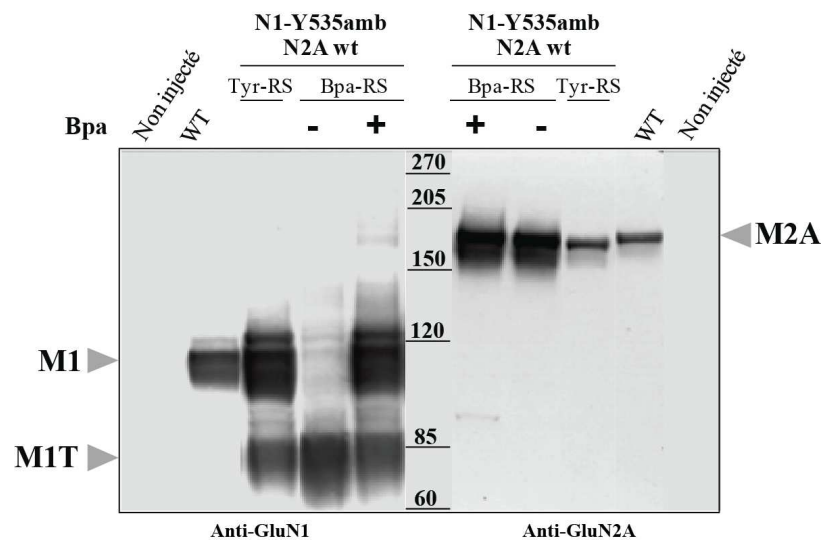


Figure 2.1. L'orthogonalité de la paire ARNt-suppresseur/BpaRS est respectée. Immunoblots obtenus à partir d'ovocytes de *Xénope* dans lesquels ont été injectés les ADNc codant pour l'ARNt-suppresseur YAM, la BpaRS ou TyrRS, et les sous-unités GluN1-Y535amb et GluN2Awt. Les ovocytes injectés avec la BpaRS sont incubés (+) ou non (-) en présence de Bpa (1 mM). L'anticorps anti-GluN1 reconnaît la région 103-116 kDa du NTD. En absence d'UAA dans le milieu, on détecte seulement une sous-unité GluN1 tronquée (M1T ~ 70 kDa) ce qui démontre que la synthèse de la

chaîne polypeptidique de GluN1 s'est arrêtée au codon-stop ambre, la BpaRS n'a donc pas incorporé de Tyr à la place du Bpa. En présence d'UAA, la sous-unité GluN1 entière est présente (bande M1 détectée à ~ 110 kDa), preuve que le Bpa a bien été incorporé. M2 indique les bande correspondant au monomère GluN2 (~ 180 kDa)

Cette méthode innovante présente de nombreux avantages dont certains ont été mis en évidence dans cet article. L'efficacité de l'adaptation, aux ovocytes, des paires ARNt/aaRS utilisées dans les cellules de mammifère, a beaucoup simplifié l'approche. Par coinjection des quatre plasmides (codant pour l'enzyme aminoacyl-ARNt-synthétase, l'ARNt-suppresseur et les deux sous-unités du rNDMA, dont l'une possède la mutation ambre) et incubation des ovocytes avec l'UAA d'intérêt, nous sommes parvenus à faire exprimer à la membrane des rNMDAs GluN1/GluN2A ou GluN2B entiers et fonctionnels. L'expansion du code génétique, dont on a démontré la faisabilité dans les ovocytes, est donc une méthode relativement fiable (pas ou peu d'incorporation d'acides aminés endogènes, pas de perturbation des fonctions de base du récepteur) et efficace (incorporation de Bpa et AzF).

Cette technique présente cependant certains inconvénients ou limitations. Tout d'abord, l'approche "exclusivement génétique" avec l'utilisation de paires ARNt/aaRS spécifiquement élaborées pour l'incorporation d'UAAs donnés ne permet d'incorporer qu'un nombre limité d'UAAs dans une protéine, une dizaine environ (même si des travaux récents ont permis d'obtenir des tyrosil-ARNt synthétases dérivées de l'*Archaea* assurant l'incorporation d'une quarantaine de nouveaux UAAs dans les protéines (Thibodeaux et al., 2010)). En effet, sélectionner de nouvelles paires ARNt/aaRS orthogonales est un processus compliqué (criblage de banque ; Martin & Schultz), c'est pourquoi il est très intéressant de pouvoir les adapter d'un organisme à l'autre, comme nous avons pu le faire avec ces dérivés de tyrosine-acyl synthétase. Ces paires ARNt/aaRS sont efficaces, toutefois leur utilisation nécessite certaines précautions. En effet, afin d'obtenir le meilleur rendement et de limiter l'incorporation d'acides aminés endogènes (Tyr) lors de la lecture du codon-stop ambre, il est important de déterminer avec précision les concentrations idéales en ADNc de l'ARNt et de l'aaRS. Par ailleurs, nous avons pu observer des différences entre les paires ARNt/BpaRS et ARNt/AzFRS : la BpaRS est plus spécifique et moins réactive que l'AzFRS, qui incorpore plus souvent des acides aminés endogènes à la place de l'UAA. Cette infidélité demeure cependant rare une fois les conditions en concentrations de divers plasmides optimisées.

Nous sommes parvenus à exprimer correctement les rNMDAs mutants à la surface des ovocytes, cependant, quelque soit l'aaRS, le taux d'expression est plus faible que dans le cas de récepteurs sauvages (qui peut atteindre 100% selon le lot d'ovocytes). Dans nos expériences, l'UAA est dilué dans le milieu d'incubation de l'ovocyte, à des concentrations de 1 mM et 2 mM respectivement, pour le Bpa et l'AzF. Bien que ces concentrations soient élevées (on peut même diminuer la concentration en AzF à 1 mM sans que cela n'affecte le taux d'expression, ni la taille des courants), il est possible que la disponibilité de l'UAA ne soit pas idéale. Une solution serait de fournir l'UAA directement à l'ovocyte, par micro-injection, en même temps que l'injection des plasmides codants. C'est la solution pour laquelle ont opté T.Kalstrup et R.Blunck afin d'incorporer l'UAA dans la séquence protéique d'une sous-unité du canal potassique Shaker. Cet article, publié en 2013 (Kalstrup et al., 2013), est une nouvelle preuve du succès de l'expansion du code génétique dans les ovocytes de *Xénope*. Ils ont par ailleurs introduit les séquences codantes de l'ARNt et de l'aaRS dans un même plasmide, ce qui permet la synthèse simultanée de l'un et de l'autre par la machinerie de traduction de la cellule, et ont injecté ce plasmide un jour avant l'UAA et l'ARNm de la sous-unité Kv, transcrit *in vitro*. Cette dissociation de l'injection en deux étapes leur permet d'optimiser les chances d'incorporation de l'UAA. Quant à la micro-injection de l'UAAs directement dans l'ovocyte, elle permet d'assurer sa biodisponibilité pour la machinerie de traduction.

Dans leur article, T.Kalstrup et R.Blunck incorporent au niveau du segment transmembranaire M4 des sous-unités du canal *Shaker* un UAA fluorescent, l'Anap (voir Introduction **4.2.2** et Fig. **2.2** ci-dessous). L'Anap est un acide-aminé de petite taille, dont la fluorescence est sensible à l'environnement : l'intensité et la longueur d'onde d'émission qui caractérisent sa fluorescence sont en effet sensibles à la polarité des résidus se trouvant à proximité de l'UAA (Wang et al., 2006). L'Anap incorporé dans une protéine permet donc de détecter les changements conformationnels de cette protéine, ses éventuelles interactions, ses modifications et son activité dans des cellules vivantes. Cela en fait un composé fluorescent idéal pour la pratique de la fluorométrie à potentiel imposé ("Voltage-Clamp Fluorometry" ou VCF), une technique qui combine électrophysiologie et analyse de fluorescence et qui permet de corréliser les changements conformationnels d'un récepteur ionotropique ou canal ionique à son activité électrique ("gating" du canal). Cette approche a permis à T.Kalstrup et R.Blunck de suivre les mouvements du TM4 au cours de l'activation du canal, et ainsi de décrire les

dynamiques structurales de l'ensemble du processus de "gating" du canal potassique, depuis l'état fermé à l'ouverture du pore. L'introduction d'un UAA fluorescent dans une sous-unité de rNMDA et son utilisation pour étudier les dynamiques du récepteur par VCF, constituent l'une des applications possibles de l'expansion du code génétique à l'étude des rNMDAs. A présent que nous avons démontré sa faisabilité dans les ovocytes de *Xénope*, nous pouvons envisager d'y incorporer divers types d'UAAs. Il existe d'autres UAAs fluorescents que l'Anap, notamment le dansylalanine (incorporé dans la levure; Summerer et al., 2006), le L-(7-hydroxycoumarin-4-yl) Ethylglycine (incorporé dans *E.coli* ; Wang et al., 2006) et le (S)-1-carboxy-3-(7-hydroxy-2-oxo-2H-chromen-4-yl)propan-1-aminium (CouAA) dans *E.coli* ; Charbon et al., 2011). L'UAA fluorescent pourrait être inséré à divers sites du rNMDA, citons par exemple les interfaces entre les ABDs ou entre les NTDs des quatre sous-unités du récepteur. Les analyses simultanées de la fluorescence et des courants enregistrés à potentiel imposé (VCF) donneraient des indications sur les changements conformationnels au sein du tétramère et les réorganisations des interfaces au cours de l'activation du récepteur.

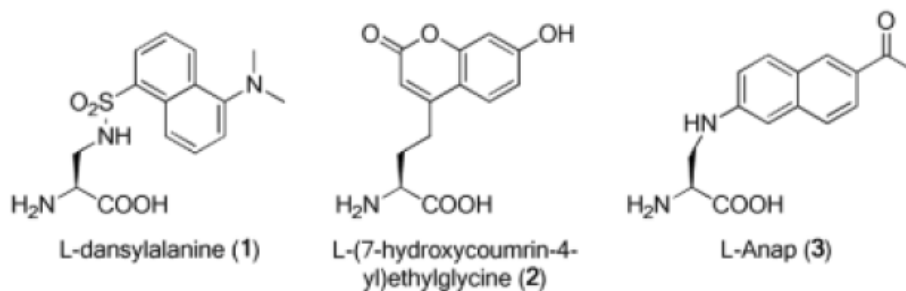


Figure 2.2. Divers acides-aminés non-naturels fluorescents peuvent être incorporés dans les protéines. Dans cette figure sont représentées les structures chimiques du dansylalanine, du L-(7-hydroxycoumarin-4-yl) Ethylglycine et du 3-(6-acetylnaphtalen-2-ylamino)-2-aminopropanoic acid (Anap)

Notons enfin que la chimie de la *p*-azido-*L*-phenylalanine (AzF) est si variée (Morris et al., 2013 et voir Introduction 4.2 et 4.3) que rien qu'avec cet UAA, nous disposons de toute une gamme d'expériences permettant d'étudier les rNMDAs. Actuellement au laboratoire, nous essayons d'introduire des sondes biophysiques par l'intermédiaire de réactions de conjugaison entre groupe azide de l'AzF et un alcyne cyclique (la cyclooctine par exemple, voir Introduction 4.2.2).

2.2. Création d'un récepteur NMDA contrôlé par la lumière par incorporation d'acides-aminés photo-réactifs : application à l'étude des interfaces entre domaines N-terminaux.

2.2.1. Contexte de l'étude

Notre article publié dans la revue ChemBioChem (Ye et al., 2013) a démontré la possibilité d'incorporer dans un récepteur NMDA (rNMDA) un acide-aminé non-naturel (UAA) grâce à l'expansion du code génétique. Les UAAs testés au cours de ce travail, le *p*-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa) et le *p*-azido-L-phénylalanine (AzF), sont des acides-aminés photo-réactifs. Après exposition à un rayonnement UV, les groupes benzoyl (du Bpa) et azide (de l'AzF) se transforment en radicaux capables d'attaquer entre autre les liaisons C-H d'acides-aminés voisins. La formation d'une liaison covalente entre l'AzF et ce résidu-cible est susceptible de perturber le comportement du récepteur, son activité et ses propriétés fonctionnelles. L'analyse de ces modifications, par biochimie et par électrophysiologie, combinée à l'étude des structures cristallographiques ou des modèles existants, fournit des indications précieuses sur la structure du récepteur et le rôle des différents domaines dans le contrôle de l'activité du canal.

Les domaines N-terminaux (NTDs) des rNDMA sont des régions flexibles et dynamiques, qui jouent un rôle complexe et essentiel dans le fonctionnement du récepteur, que ce soit son assemblage, ou le contrôle de son activation (Paoletti, 2011 ; Furukawa, 2012 ; voir Introduction 2.2.5.4 et 3.3). Contrairement aux domaines de liaison des agonistes (ABDs) et au domaine transmembranaire (TMD), les NTDs sont des régions peu conservées d'une sous-unité des rNDMA à une autre (voir Fig. 2.24 de l'Introduction 2.2.6.1). Cette disparité de séquences permet aux NTDs de contrôler la diversité biophysique et pharmacologique des rNDMA. Pour cette présente étude, qui fait l'objet d'un article actuellement en révision pour une parution dans la revue PNAS, nous avons cherché à déterminer les caractéristiques structurales des NTDs des rNDMA à l'origine de leur dynamique et de leur rôles distincts selon la sous-unité GluN2 associée à GluN1 dans le récepteur tétramérique. Récemment, la

structure d'un hétérodimère de NTDs GluN1/GluN2B, en complexe avec un inhibiteur allostérique l'ifenprodil, a été cristallisée avec une résolution de 2.6 Å (Karakas et al., 2011). Cette structure permet de corrélérer des données structurales aux observations fonctionnelles, qui mettaient en évidence un contrôle de l'activité du canal ionique par les NTDs. Néanmoins, cette structure ne résout pas tout, certaines questions persistent notamment sur l'arrangement des NTDs dans le tétramère et sur la nature précise des interfaces au sein du dimère fonctionnel de NTD GluN1/GluN2B. Par ailleurs, nous ne disposons à l'heure actuelle que de la structure cristallographique d'un dimère de NTDs GluN1/GluN2B. Nous ignorons donc si cette structure, cet arrangement, sont conservés dans d'autres sous-types de rNMDAs, notamment GluN1/GluN2A. A défaut de structure cristallographique, une étude par homologie du dimère de NTDs GluN1/GluN2A peut malgré tout de mettre en évidence certaines spécificités structurales à l'origine, entre autre, des mécanismes fonctionnels distincts d'un sous-type de rNMDA à l'autre.

Nous avons donc appliqué l'expansion du code génétique à l'étude des interfaces entre NTDs dans des rNMDAs de type GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B, exprimés dans des ovocytes de *Xénope*. Pour cela, nous avons introduit un AzF photo-activable, à la position GluN1-Y109. Ensuite, par des approches biochimiques et électrophysiologiques, nous avons analysé les effets de cette mutation et d'une exposition des ovocytes aux UVs sur le fonctionnement des récepteurs GluN1-Y109AzF/GluN2Awt et GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt. Les résultats de ce travail nous ont permis de mettre en évidence l'importance du lobe supérieur du NTD de la sous-unité GluN1 dans le contrôle de l'activation du canal ionique d'un rNMDA de type GluN1/GluN2B.

Afin de valider ces observations, nous avons dans un deuxième temps confirmé l'existence d'une nouvelle interface formée par le lobe supérieur (UL) du NTD de GluN1 et le lobe inférieur (LL) du NTD de GluN2 et impliquée dans le contrôle des ouvertures/fermetures des NTDs des sous-unités GluN2. Cette interface GluN1-UL/GluN2-LL est une région peu étendue dont la séquence en acides-aminés diffère profondément d'une sous-unité GluN2 à l'autre. En particulier, nous avons identifié à cette interface deux groupes de résidus qui par l'intermédiaire de liaisons ioniques et de ponts hydrogènes, participent aux contacts électrostatiques entre les deux sous-unités, stabilisant ainsi l'état fermé des NTDs des sous-unités GluN2. En perturbant ces interactions, nous sommes parvenus à "manipuler", et plus précisément augmenter, l'activité du canal.

2.2.2. Article 3

Genetically encoding a light-switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces

Shujia Zhu ^{1-4,&}, Morgane Riou ^{1-3,&}, Stéphanie Carvalho ¹⁻³, Pierre Paoletti ^{1-3*} and Shixin Ye ^{1-3*}

1. Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (IBENS), Ecole Normale Supérieure, Paris, France.
2. Institut National de la Santé et de la recherche Médicale (INSERM), U1024, Paris, France
3. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8197, Paris, France.
4. Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai, China.

& equally contributing authors

* co-last authors.

Correspondence should be addressed to: pierre.paoletti@ens.fr or yelehman@biologie.ens.fr

Genetically encoding a light-switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces

Shujia Zhu^{1,4,&}, Morgane Riou^{1-3,&}, Stéphanie Carvalho¹⁻³, Pierre Paoletti^{1-3,*} and Shixin Ye^{1-3,*}

1. Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure (IBENS), École Normale Supérieure, Paris, France. 2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1024, Paris, France. 3. Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR 8197, Paris, France. 4. Shanghai Key Laboratory of Brain Functional Genomics, East China Normal University, Shanghai, China.

Submitted to Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America

Reprogramming receptors to artificially respond to light has strong potential for molecular studies and interrogation of biological functions. Here we design a light-controlled ionotropic glutamate receptor by genetically encoding a photo-reactive unnatural amino acid (UAA). The photo-cross-linker p-azido-L-phenylalanine (AzF) was encoded in NMDA receptors (NMDARs), a class of glutamate-gated ion channels that play key roles in neuronal development and plasticity. AzF incorporation in the obligatory GluN1 subunit at the GluN1/GluN2B N-terminal domain (NTD) upper lobe dimer interface allosterically leads to an irreversible inhibition of channel activity upon UV illumination. In contrast, when pairing the UAA-containing GluN1 subunit with the GluN2A subunit, light-dependent inactivation is completely absent. By combining electrophysiological and biochemical analyses, we identify subunit-specific structural determinants at GluN1/GluN2 NTD dimer interfaces that critically dictate UV-controlled inactivation. Our work reveals that the two major NMDAR subtypes GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B differ in their ectodomain subunit interactions, GluN1 NTD coupling more tightly to GluN2B, than GluN2A, NTD. It also paves the way for engineering light-sensitive ligand-gated ion channels with subtype-specificity through the genetic code expansion.

ligand-gated ion channel | unnatural amino acid | glutamate receptors | photo-cross-linking

Introduction

Over the past decade, ionotropic glutamate receptors (iGluRs), which mediate most excitatory neurotransmission in the brain, have provided a suitable platform for the engineering of photo-sensitive receptors (1-2) allowing optical control of neuronal activity (3-4). Current approaches however rely on synthetic photo-reactive ligands, including photo-caged (5-6), photo-chromic (7), or photo-switchable tethered (8-9) ligands. The major challenge for the first two types of ligands is often posed by the lack of target specificity (iGluRs share the same agonist glutamate). Although the third category of ligands targets a specific type of receptors, it requires cysteine-mediated post-translational modification, which can be complicated due to the presence of endogenous cysteines in proteins (both on and off target).

Introducing light-sensitive amino acids into proteins provides an alternative solution to transform ligand-gated ion channels (LGICs) into light-sensitive receptors. Here we show the feasibility based on the genetic code expansion. This recent development in molecular biology allows the site-specific incorporation of unnatural amino acids (UAAs) into proteins with unique chemical properties that are absent in the natural amino acids (10-11). The methodology relies on the read-through of an unassigned codon (commonly the amber stop codon) in an mRNA by a suppressor tRNA aminoacylated with a desired UAA. The recent development of engineered aminoacyl-tRNA synthetase pairs with altered amino acid specificity permits to achieve aminoacylation in the expression system *in situ* without the need of any chemical synthesis step, therefore, advancing to the all-genetic based level (10-12). The encoding of photo-reactive UAAs into a specific

site provides two key advantages. Firstly, UAAs are genetically encoded therefore insuring that the light-triggered functional response comes from a specific receptor. Secondly, UAAs are comparatively small such that perturbation of the native structure (and function) of a protein is minimized.

Our design approach takes advantage of the recent development of the genetic code expansion in *Xenopus* oocytes (13), which is a classical vehicle for heterologous expression and functional characterization of LGICs. We focused on NMDA receptors (NMDARs), a class of iGluRs that control synaptic strength (14). NMDARs are obligatory heterotetramers commonly composed of two glycine-binding GluN1 subunits and two glutamate-binding GluN2 subunits. While GluN1 is encoded by a single gene, there are four types of GluN2 subunits (GluN2A-D) encoded by four different genes, which endow NMDARs with different properties including channel open probabilities (P_o) and sensitivities to allosteric modulators (14). The extracellular region of both GluN1 and GluN2 subunits consist of a tandem of large clamshell-like domains comprising an N-terminal domain (NTD) and an agonist-binding domain (ABD) (Fig. 1A). Besides playing essential roles in receptor assembly (15-16), recent studies of the NTDs have also revealed that the individual GluN2 (17-19) and GluN1 (20) NTDs fine-tune NMDAR gating and pharmacological properties by undergoing large-range conformational changes. The recent X-ray crystal structure of a GluN1/GluN2B NTD complex reveals a unique arrangement of the two NTD protomers with distinct intersubunit interactions (21). However,

Significance

The design of protein receptors responsive to light stimuli has wide-ranging applications in structure-function studies and optogenetics. We present here the design of a light sensitive NMDA receptor by introducing through the genetic code expansion a photo-reactive moiety carried by a single unnatural amino acid. NMDA receptors form glutamate-gated ion channels that are essential mediators of synaptic plasticity associated with learning and memory. By exploring the molecular mechanisms and subunit dependence of the light-induced receptor inactivation, we find that the two major NMDA receptor subtypes GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B differ in their ectodomain subunit interactions. Besides providing important new information about NMDA receptor molecular structure, our work opens the possibility of using engineered light-sensitive NMDA receptors to manipulate neuronal function.

Reserved for Publication Footnotes

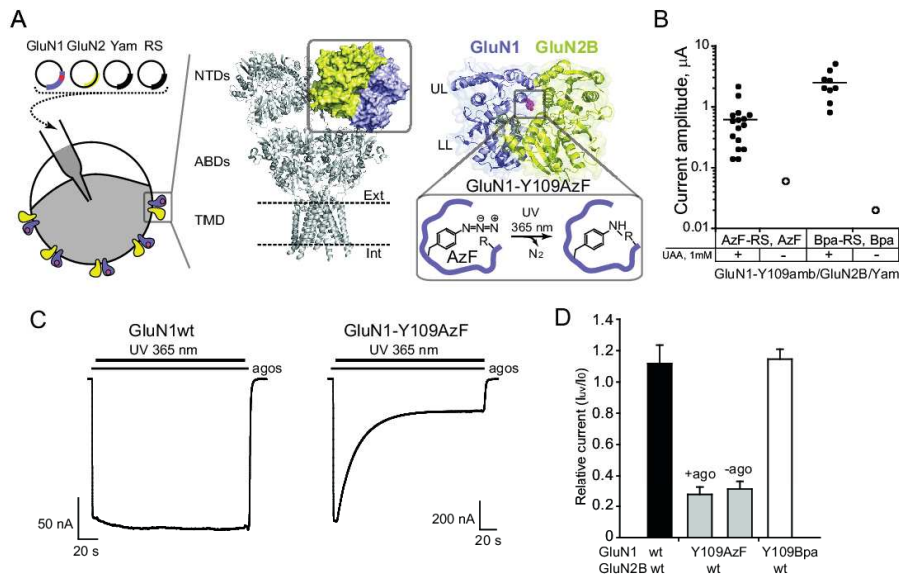


Fig. 1

Fig. 1. Light inactivation of GluN1/GluN2B NMDARs incorporating a genetically-encoded photoactive UAA. (A) Four plasmids encoding the GluN1 subunit with an amber stop codon at position Y109 (red dot), the wild-type (wt) GluN2 subunit, the suppressor tRNA (Yam), and the engineered tRNA synthetase (RS) were co-injected into *Xenopus* oocytes. Middle panel: Crystal structure of the GluA2 AMPA receptor (pdb: 3KG2, (39)). The three major domains, N-terminal domain (NTD), agonist-binding domain (ABD) and transmembrane domain (TMD) are arranged in layers. One NTD dimer is highlighted. Right panel: Crystal structure of the NMDAR GluN1/GluN2B NTD heterodimer (pdb: 3QEL, (21); ifenprodil molecule omitted for clarity). UL, upper lobe; LL, lower lobe. The GluN1-Y109 site is highlighted with purple spheres. On UV irradiation, the azide moiety generates a bi-radical which subsequently can react with a nearby residue to form a covalent adduct. (B) Current amplitudes from oocytes injected with plasmids as indicated, in the absence or presence of UAAs. For each condition, 20 oocytes were tested. Only currents >10 nA were plotted. (C) Representative current traces showing UV-induced current inhibition of GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors but not wt GluN1/GluN2B receptors. (D) UV-induced current modifications at wt GluN1/GluN2B (1.11 ± 0.13 ; $n=8$), GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt with agonist (0.28 ± 0.05 ; $n=16$), GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt without agonist (0.31 ± 0.05 ; $n=5$), and GluN1-Y109Bpa/GluN2Bwt receptors (1.15 ± 0.06 ; $n=5$). Error bars, SD.

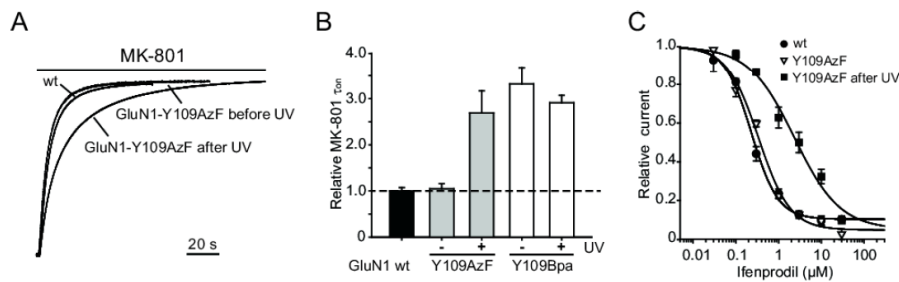


Fig. 2

Fig. 2. UV treatment of GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors alters both gating and ifenprodil sensitivity. (A) MK-801 inhibition of wild-type (wt) GluN1/GluN2B receptors and GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors before and after UV treatment. (B) Relative MK-801 inhibition kinetics from oocytes expressing either wt GluN1/GluN2B receptors (1.00 ± 0.07 ; $n=7$), GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors before (1.05 ± 0.11 ; $n=7$) and after (2.69 ± 0.48 ; $n=9$) UV treatment, or GluN1-Y109Bpa/GluN2B receptors before (3.32 ± 0.37 ; $n=6$) and after (2.91 ± 0.16 ; $n=4$) UV treatment. Error bars, SD. (C) Ifenprodil sensitivity of wt GluN1/GluN2B receptors and GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors before and after UV treatment. IC_{50} (μ M), Hill coefficients (n_H), maximal inhibition values are, respectively: 0.23 ± 0.02 , 1.38, 0.90 for wt GluN1/GluN2B receptors; 0.34 ± 0.04 , 1.18, 0.95 for GluN1-Y109AzF/GluN2B before UV, and 2.35 ± 0.34 , 0.81, 0.95 after UV. $n=3-4$. Error bars, SD.

the importance of these dimer interfaces in the subunit-specific receptor regulation is poorly understood. Here, we show that encoding the photo-reactive UAA *p*-azido-L-phenylalanine (AzF) at the NTD upper lobe dimer interface in GluN1/GluN2B receptors serves as a photo-switch, triggering irreversible decrease of channel activity upon UV exposure. We further investigated the photo-induced conformational changes at the NTD dimer interfaces, as well as the subunit-dependent regulations. Our results not only proves the feasibility of designing photo-sensitive NMDARs by introducing a genetically-encoded photo-reactive UAA at a conformational sensitive site, but also reveal new aspects of the NMDAR assembly as highly subtype specific. The design of photo-sensitive receptors with subtype specificity through the genetic code expansion has strong potential for wide-

ranging applications, from detailed structure-function studies to *in vivo* manipulations.

Results

Encoding photo-reactive UAAs in the GluN1 NTD

To genetically encode photo-reactive UAAs, we chose the GluN1-Y109 site, which situates at the NTD upper lobe-upper lobe (UL/UL) dimer interface according to the X-ray crystal structure of the ifenprodil-bound GluN1/GluN2B NTD dimer (21) (Fig. 1A). Using conventional mutagenesis to introduce point mutations at this site, we found that depending on the side chain property, the receptor gating can be bi-directionally manipulated, as assessed by the inhibition kinetics of MK-801, an selective NMDAR open channel blocker classically used to

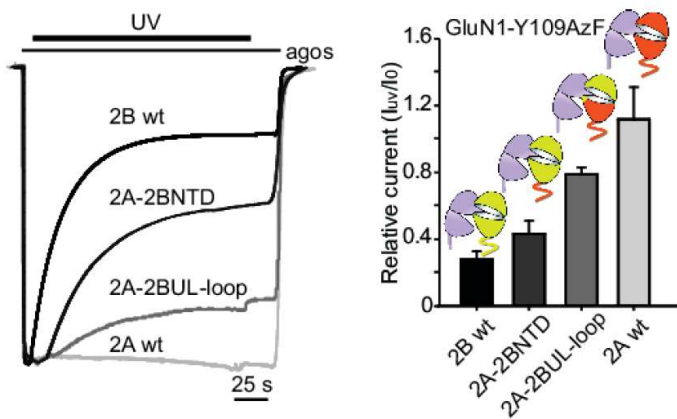


Fig. 3

Fig. 3. UV-induced functional changes at the GluN1-Y109 position are GluN2 NTD subtype specific. Left: Representative current traces of UV-induced effects on receptors incorporating GluN1-Y109AzF and wild-type (wt) GluN2B (2B wt), GluN2A-2BNTD (2A-2BNTD), GluN2A-2BUL-loop (2A-2BUL-loop; the loop represents GluN2B-₂₀₈MSLDDGD) or wt Glu2A (2A wt). Right: Relative currents (I_{uv}/I₀) from receptors containing the GluN1-Y109AzF subunits and 2B (0.28 ± 0.05; n=16), 2A-2BNTD (0.43 ± 0.08; n=6), 2A-2BUL-loop (0.78 ± 0.04; n=5) or 2A (1.10 ± 0.22; n=5) subunit. Error bars, SD.

index receptor channel P_o (17) (Fig. S1A,B). In agreement with previous studies (22), we also observed that mutations at this position affect sensitivities to various allosteric modulators including proton, zinc and spermine (Fig. S1C,D,E). We therefore hypothesized that encoding photo-reactive UAAs at this site may affect receptor activity by locking the NTD conformation under light stimuli.

Based on our recent establishment of the genetic code expansion in *Xenopus laevis* oocytes (13), we generated GluN1-Y109amb containing an amber stop codon at position Y109. Robust NMDAR-mediated currents were observed after co-injection with cDNAs encoding GluN1-Y109amb, wild-type GluN2B, orthogonal suppressor tRNA (Yam) and mutant aminoacyl tRNA synthetase (RS) together with the corresponding UAA (AzF or p-benzoyl-L-phenylalanine (Bpa)) added in the external medium (Fig. 1B). In contrast, oocytes incubated in the absence of UAAs generated no or only tiny responses (<100 nA) (Fig. 1B) confirming the successful and efficient incorporation of AzF and Bpa at the GluN1-Y109 site through the genetic code expansion. Continuous UV (365 nm) illumination of maximally-activated GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors produced strong receptor inhibition, characterized by a progressive and irreversible current reduction (I_{uv}/I₀ = 0.28 ± 0.05, n=16; current decrease time constant τ = 25.6 ± 4.6 s, n=8) (Fig. 1C,D). In contrast, wild-type receptors were almost unaffected (I_{uv}/I₀ = 1.11 ± 0.12, n=8; Fig. 1C,D), confirming that the UV treatment *per se* doesn't cause significant functional changes or photo damaging. To test the influence of agonists on the UV-induced inactivation, we applied UV treatment in the absence of agonists. The relative currents I_{uv}/I₀ did not differ with or without agonists (Fig. 1D), indicating that the UV-induced channel inhibition is independent of receptor activation (i.e. agonist binding). Surprisingly, no UV dependent channel inhibition was observed in the case of GluN1-Y109Bpa, demonstrating that the photo switching is specific to the azido moiety of AzF (Fig. 1D).

Photo switching locks the receptor in a low P_o mode

The UV-induced current reduction may either render receptors completely inactive, or decrease their channel activity. To distinguish between these two possibilities, we assessed the photo-switched channel activity. After UV treatment, MK-801 inhibition kinetics were significantly slowed down, indicating a marked de-

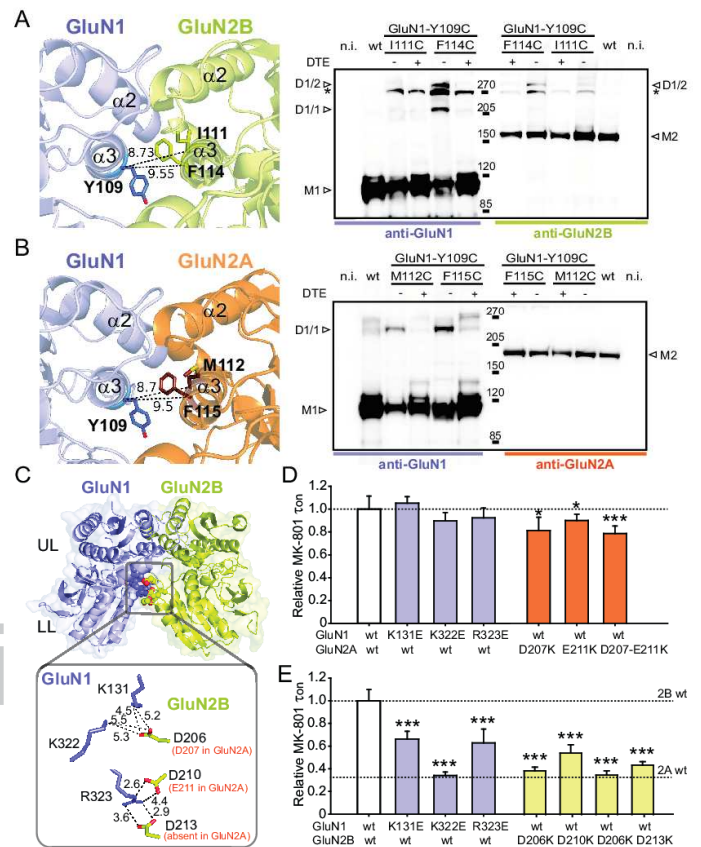


Fig. 4

Fig. 4. Structural basis for the differential GluN1/GluN2 NTD dimer interfaces. (A-B) Differential UL/UL interaction in GluN2A- and GluN2B-containing receptors. Left: zoom up view of the UL/UL interface in either GluN1/GluN2A NTD dimer model or the GluN1/GluN2B NTD dimer crystal structure (pdb: 3QEL, (21)). Residues mutated into cysteines are represented in sticks with Ca-Ca distances indicated (in Å). Right: Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wild-type (wt) or mutant subunits as indicated. M1 indicates the expected GluN1 monomer (~110 kDa); M2 the GluN2A or GluN2B monomer (~180 kDa); D1/1 the GluN1 homodimer (~220 kDa) and D1/2 the GluN1/GluN2 heterodimer (~290 kDa). Treatment with (+) or without (-) DTE is also shown. * indicates a non-specific band. n.i., non-injected oocytes. (C) Electrostatic interactions at the GluN1-UL/GluN2-LL interface as observed in the GluN1/GluN2B NTD dimer crystal structure (distances indicated in Å). (D-E) Relative MK-801 inhibition kinetics of receptors incorporating wt or mutant GluN1 and GluN2 subunits. Values in (D): wt (1.00 ± 0.11), GluN1-K131E (1.05 ± 0.06), GluN1-K322E (0.90 ± 0.07), GluN1-R323E (0.92 ± 0.09); GluN2A-D207K (0.81 ± 0.12), GluN2A-E211K (0.90 ± 0.06), and GluN2A-D207K-E211K (0.79 ± 0.07). Values in (E): wt (1.00 ± 0.10), GluN1-K131E (0.66 ± 0.07), GluN1-K322E (0.34 ± 0.03), GluN1-R323E (0.63 ± 0.12); GluN2B-D206K (0.38 ± 0.03), GluN2B-D210K (0.54 ± 0.07), GluN2B-D206K-D210K (0.35 ± 0.04), and GluN2B-D213K (0.43 ± 0.03). n = 4-16. *P<0.05, ***P<0.001, Student's t-test. Error bars, SD.

crease of P_o (Fig. 2A,B). This indicates that UV illumination does not completely silence the receptors but rather switches them into a low activity mode. MK-801 inhibition kinetics for the GluN1-Y109AzF mutant before UV treatment were similar to those of wild-type receptors, suggesting that the introduction of AzF at this position causes minimal change in receptor function. In contrast to the AzF, channel activity of GluN1-Y109Bpa/GluN2B receptors both before and after UV exposure were significantly lower compared to wild-type receptors (Fig. 2B).

To evaluate further the impact of photo-illumination on GluN1-Y109AzF/GluN2B receptor properties, we tested receptor sensitivity to allosteric modulators. We first tested sensitivity to ifenprodil, the prototypical GluN2B-selective allosteric in-

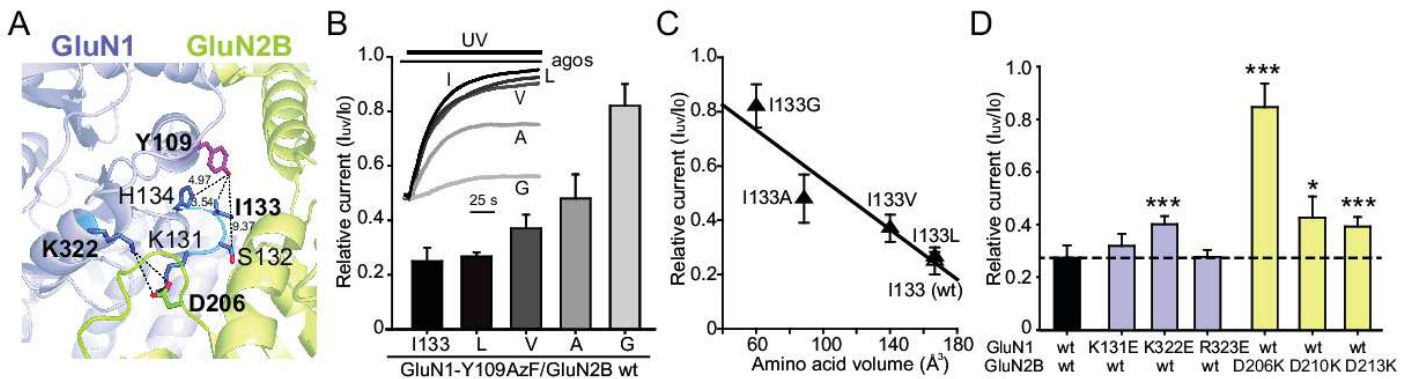


Fig. 5

Fig. 5. Exploration of the photo-cross-linking site. (A) Zoom up view of the local environment around the GluN1-Y109 site in the crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD heterodimer (pdb: 3QEL, (21)). GluN1-Y109 and the potential candidates on the GluN1-₁₃₁KSIH-loop for UV cross-linking are highlighted and distances indicated (in Å). The charged residues GluN1-K322 and GluN2B-D206 at the GluN1-UL/GluN2B-LL interface are also highlighted. (B) Changes in current amplitude after UV illumination on GluN1-Y109AzF/GluN2B wt receptors or receptors incorporating an additional substitution (L, V, A or G) at the GluN1-I133 position. Values are: 0.28 ± 0.05 , 0.28 ± 0.02 , 0.37 ± 0.05 , 0.48 ± 0.09 , 0.82 ± 0.08 ; $n=3-16$. Inset: Normalized current traces for GluN1-I133 and its substitutions. (C) The GluN1-I133 residue volume and the UV-induced current reduction are strongly correlated. The line represents a linear regression fit to the data points ($R^2 = 0.89$). (D) Disruption of the UV effect by destabilizing the GluN1-UL/GluN2B-LL electrostatic contacts. Each bar represents the UV-induced current modification of GluN1-Y109AzF/GluN2B receptors incorporated with various UL/LL interface mutants. Values are (from left to right): 0.28 ± 0.05 , 0.32 ± 0.05 , 0.40 ± 0.03 , 0.28 ± 0.03 , 0.85 ± 0.09 , 0.43 ± 0.08 , 0.40 ± 0.04 . $n=4-16$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, Student's *t*-test. Error bars, SD

hibitor, which binds at dimer interface between the GluN1 and GluN2B NTDs (21). Ifenprodil sensitivity of photo-treated AzF-encoded receptors was markedly reduced compared to that of before UV treatment and wild-type receptors, manifested by a ~ 10 fold increase in IC_{50} (Fig. 2C). In contrast, the sensitivity of UV-treated receptors to Zn^{2+} , an allosteric inhibitor binding to the GluN2B NTD interlobe cleft and presumably promoting its closure (17, 23), was not affected, suggesting that UV did not lock GluN2B NTD in a closed state (Fig. S2A). We also observed that the glutamate sensitivity was moderately increased after UV treatment, while glycine sensitivity was unaffected (Fig. S2B,C). These results are in line with previous findings (20) that an alteration of GluN1 (or GluN2) NTD conformation primarily affects binding of glutamate, but not of glycine. In all measurements, the AzF mutant receptors before UV treatment showed the same values as wild-type receptors, confirming that introduction of AzF creates no significant perturbation.

Photo switching is receptor-subtype specific

We next paired GluN1-Y109AzF mutant subunit with the wild-type GluN2A subunit – the most abundant GluN2 subunit in the adult brain (14). Since the GluN1 subunit is an obligatory subunit shared by all NMDAR subtypes, similar photo-inactivation between GluN2A- and GluN2B-receptors could be anticipated. Strikingly, however, GluN1-Y109AzF/GluN2A receptors were almost completely insensitive to UV illumination (Fig. 3; $I_{uv}/I_0 = 1.10 \pm 0.22$, $n=6$). The incorporation of AzF in GluN2A receptors was confirmed by comparing oocytes incubated in the presence or absence of AzF (Fig. S3A). Moreover, the channel P_o remained similar before and after UV treatment (Fig. S3B), providing additional evidence that the photo-switching does not occur in GluN2A receptors. To further assess the role of the GluN2B NTD in photo-switching, we generated chimera constructs. First, two GluN2A-GluN2B chimeras with swapped NTD previously generated (17) were applied, namely 2A-2BNTD and 2B-2ANTD. Second, two new GluN2A chimeric receptors were developed, 2A-2BUL-loop and 2A-2BUL, containing progressively smaller portions of the GluN2B NTD (see Methods). The UV-induced channel inhibition was significantly restored in the 2A-2BNTD containing receptors ($I_{uv}/I_0: 0.43 \pm 0.08$) (Fig. 3), while it was completely abolished in 2B-2ANTD (Fig. S4A). Between 2A-2BUL-loop and 2A-2BUL chimeras (Fig. 3 and S4A), only 2A-2BUL-loop restored the UV effect to a detectable level. There

are thus structural determinants absent in GluN2A receptors and specific to GluN2B NTD that confer light-sensitivity to AzF-incorporated receptors.

To further explore for potential differences in the NTD arrangement between GluN2A and GluN2B receptors, we performed experiments using sulfhydryl-modifying MTS compounds, reagents that have been extensively used to investigate the accessibility of a site and associated conformational changes in proteins (17, 24). We focused on the GluN1-Y109 site and checked that functional properties of GluN1-Y109C/GluN2B receptors remain unchanged compared to wild-type GluN1/GluN2B receptors (Fig. S1). Among the four types of MTS compounds tested, only MTSEA produced a massive current inhibition (Fig. S5A). Comparing GluN2A, GluN2B, and the different chimera constructs, the relative inhibitions induced by the MTSEA share a strikingly similar trend as the UV-induced inhibitions (Fig. S4B and S5B), with GluN2B showing the strongest irreversible inhibition and GluN2A the smallest. The completely parallel trends observed in both UV and MTSEA induced channel inhibition on the entire series of chimera constructs strengthen the idea that there is a fundamental difference in the NTD dimer assembly between GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors.

Differential GluN1/GluN2 NTD dimer assembly

The crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD dimer has revealed two major interfaces of contacts between the two neighboring domains (21). The first one involves helical contacts between GluN1 NTD UL and GluN2B NTD UL, an interface shared by other iGluRs (25). The second one is unique to NMDARs and involves GluN1 NTD UL and GluN2B NTD LL. This interface participates in stabilizing a closed-cleft conformation of the GluN2B NTD clamshell (21). To further elucidate the subunit-specific arrangement in these regions and associated functional effects, we systematically compared these two interfaces between GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors by combining biochemical and functional analyses.

We first probed the UL/UL interface using disulfide crosslinking. The UL/UL interface mainly contains hydrophobic interactions mediated by $\alpha 2$ and $\alpha 3$ helices in GluN1, and $\alpha 1$ and $\alpha 2$ helices in GluN2 (21, 26) (Fig. 4A,B). In GluN1, we utilized the GluN1-Y109C mutant generated previously since the Y109 site situates at the center of the $\alpha 3$ helix. In GluN2B, we gener-

ated GluN2B-I111C and GluN2B-F114C, both residues pointing toward GluN1-Y109 with C α -C α distances of 9.5 and 8.7 Å, respectively (Fig. 4A). In GluN2A, we generated the homologous mutations GluN2A-M112C and GluN2A-F115C (Fig. 4B). Using non-reducing westernblots from oocytes expressing full-length receptors, we observed reproducible heterodimeric formation in the case of GluN1-Y109C/GluN2B-F114C double mutants, with clear heterodimer bands detected by both GluN1 and GluN2B antibodies at the expected molecular weight (Fig. 4A and Fig. S6A,B). The GluN2B-I111C mutant showed weaker heterodimer bands that can be detected occasionally (Fig. S6B). In contrast, no detectable heterodimer band was observed for either of the two GluN1/GluN2A double cysteine mutant receptors (Fig. 4B and Fig. S6C,D). We also observed GluN1 homodimer bands likely originating from intracellular intermediates of receptor biogenesis (16) (Fig. 4A,B and Fig. S6). Overall these results suggest that GluN1/GluN2B receptors form a tighter coupling at the UL/UL interface than GluN1/GluN2A receptors.

We then probed the UL/LL interface, which can be "locked" closed in GluN1/GluN2B receptors by introducing double cysteine mutations (GluN1-L320C/GluN2B-D210C) (21). We generated GluN2A-E211C at the homologous site and observed spontaneous heterodimer formation in GluN1-L320C/GluN2A-E211C receptors (Fig. S7). In addition, we found the initial P_o for double cysteine mutants in both GluN1/GluN2A and GluN1/GluN2B receptors to be significantly decreased compared to wild-type and single cysteine mutant receptors, an effect that was reversed by DTE treatment (Fig. S8). These results reveal that the UL/LL interface captured in the GluN1/GluN2B NTD dimer structure can also form in GluN1/GluN2A receptors and impact receptor activity. Next, we designed mutations aiming to "force open" this interface. Several charged residues participating in direct inter-subunit electrostatic interactions are present at the UL/LL interface (residues K131, K322 and R323 in GluN1; D206, D210 and D213 in GluN2B; D207, E211 in GluN2A based on sequence alignment; Fig. 4C and Fig. S7B). We introduced opposite charge point mutations either on GluN1 NTD UL or GluN2 NTD LL in order to switch from electrostatic attraction to repulsion. MK-801 assays on GluN1/GluN2A mutants revealed only slight increases in P_o when introducing mutations in GluN2A, and no significant change in P_o after introducing mutations in GluN1 (Fig. 4D). In striking contrast, all mutations significantly increased P_o in the case of GluN2B receptors. Among these, GluN1-K322E and GluN2B-D206K displayed the strongest effect, with level of channel activity close to that of 'high' P_o GluN2A receptors (Fig. 4E). Based on these observations, we suggest that the UL/LL interactions are stronger in GluN1/GluN2B receptors than in GluN1/GluN2A receptors, in agreement with a model in which GluN2B NTD spends most of the time in a closed conformation while GluN2A NTD is mostly open (17).

Photo-crosslinking likely induces a closure at the NTD dimer interface

Upon UV excitation, AzF usually generates a nitrene radical and form a covalent linkage with a nearby atom at a distance of 3~4 Å (27). Based on the crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD dimer (21), we identified GluN1-I133 which situates in a four-residue loop (K131-H134) satisfying the distance criteria (Fig. 5A). This loop adopts different configurations in various GluN1 NTD crystal structures (16, 21), and displays high flexibility in molecular dynamic simulations (28). To explore the possible role of I133 in photo-cross-linking, we generated a series of double mutant receptor, mutating I133 to G, A, V, or L on the GluN1-Y109amb background. Among all AzF mutants, the smallest mutant I133G showed the strongest effect with only minimal UV-induced receptor inhibition ($I_{uv}/I_0 = 0.82 \pm 0.08$, $n=4$; Fig. 5B). Plotting UV-induced inhibition versus amino acid volume demonstrated that the two parameters were remarkably

correlated, with decreasing side chain size at I133 systematically reducing the UV-mediated effect (Fig. 5C). Due to the strong distance dependence in AzF mediated photo-cross-linking, this correlation hints to GluN1-I133 being the potential cross-linking partner. We suggest that the photo-cross-linking between AzF and GluN1-I133 "locks" the GluN1 K131-H134 loop and restricts its mobility, an effect that subsequently may alter the NTD dimer interfaces.

Since the GluN1 K131-H134 loop directly participates to the NTD UL/LL dimer interface (Fig. 5A), we hypothesized that the UV-induced conformational switch may involve a strengthening of the UL/LL interface, an effect that would translate into a decreased receptor activity. To evaluate this possibility, we tested UV-induced effects on mutants combining the GluN1-Y109AzF and "force open" GluN1 or GluN2B mutations (see Fig. 4C). Out of six double mutants, four showed a clear reduction in UV-induced inactivation compared to single mutants (Fig. 5D), as expected if the mutations introduced in the UL/LL interface hamper the UV-induced interface tightening. While modest in GluN1-K322E, GluN2B-D210K and GluN2B-D213K double mutants, the effect was considerably stronger in the GluN2B-D206K double mutant. In this latter, UV illumination produced <16% current inhibition ($I_{uv}/I_0 = 0.85 \pm 0.09$, $n=9$; Fig. 5D). Overall these results support a structural mechanism whereby receptor inactivation following UV-induced AzF photo-cross-linking proceeds through closure of the GluN1/GluN2B UL/LL dimer interface. They also reveal the key role of the ionic lock between GluN1-K322E and GluN2B-D206K in controlling receptor P_o and transducing the photo-cross-linking induced conformational switch in the GluN1 subunit to the downstream gating machinery.

Discussion

We provide here a novel step in the development of glutamate receptors that can be controlled by light. Rather than relying on modified receptor ligands (1-2), our approach exploits the genetic code expansion technology to directly introduce into the receptor a light-sensitive moiety carried by a single UAA. The genetic encoding technic is well-suited for biological applications as it allows for both receptor subtype-selectivity and cell-type specificity. It thus complements and differentiates from the existing post-translational labeling approach.

We genetically encoded a photo-reactive UAA to engineer light sensitive NMDARs. The signal of the light-controlled channel activity was detected and followed in real time using cellular electrophysiology. We have observed UV promoted receptor inactivation mediated through the photo-cross-linker AzF inserted at the GluN1-Y109 site when pairing with the GluN2B subunit. By assessing the UV sensitivity of receptor carrying structure-guided mutations, we propose that UV illumination triggers an intrasubunit photo-cross-linking event which leads to tightening of the heterodimer interface between the GluN1 NTD UL and the GluN2B NTD LL. We found the photo-inactivation to be highly receptor subtype specific, with no effect observed for GluN2A-containing receptors. We attribute the differential NTD dimer interactions as the structural determinants dictating this subtype specificity, with GluN1 and GluN2B subunits being more strongly constrained than GluN1 and GluN2A subunits. This difference in subunit association is manifested by stronger NTD interactions both at the UL/UL and UL/LL levels, this latter interface involving several GluN2B-specific electrostatic contacts. By showing that GluN1 NTD couples less tightly to GluN2A, than GluN2B, NTD, our results therefore reveal novel information about the structural determinants controlling subtype-specific properties in NMDARs. In addition, it provides a possible explanation that the subunit-selective binding of GluN2 NTD allosteric modulators (e.g. ifenprodil binding to GluN2B receptors (14, 21)) may stem

from fundamental differences in the NTD dimer assembly rather than differences in binding pockets *per se*. This subunit-selective and NTD-driven control of receptor activity appears unique to NMDARs. In AMPA/kainate receptors, the NTDs usually form much more rigid and tightly packed dimer assemblies symmetrically arranged by both UL/UL and LL/LL interactions (25, 29).

Both AzF and Bpa have been previously applied in mapping protein-protein (11, 30) and protein-ligand interactions in membrane receptors (31). Although some disadvantages have been reported associated with AzF for being unstable (27, 32) and producing higher non-specific background (31), we have observed no detectable UV-induced functional changes when using Bpa, likely due to its bulky side chain introducing structural perturbations in the receptor prior to the UV treatment. We also argue that AzF is a versatile UAA with multiple applications including serving as an infrared probe (33) and chemical handles for bio-orthogonal conjugations (34).

Although incorporating photo-reactive UAAs has been already applied in structure-function studies of LGICs, previous approach relies on the delivery of chemically modified tRNAs in oocytes (35). Our 'all-genetic' strategy which utilizes engineered orthogonal aARS/suppressor tRNA pairs has significantly enhanced biological and technical convenience (13). We envi-

sion the further development in genetically encoding varieties of photo-reactive UAAs into LGICs, such as photocaged amino acids (36-38), or UAAs containing azo-benzene moieties (10) that adopt two conformations with different wavelengths. Incorporation of those UAAs will provide possibilities to transform LGICs, allowing the "turning on" or switching receptors in between on and off states, in response to light as afforded by photo-switchable ligands (1-2). Such protein tools should provide particularly valuable in tracking receptor conformational changes during gating steps or allosteric transitions. We also foresee the development of our light-sensitive NMDARs in cultured neurons and brain slices to achieve "optogenetic" control of neuronal excitability.

Acknowledgements.

We thank Prof. Thomas Sakmar (Rockefeller University) for providing suppressor tRNA and engineered synthetase plasmids. This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-JCJC to S.Y.), the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe FRM grant DEQ2000326520 to P.P.; fellowship to S.Z.), the Fondation Pierre-Gilles-de-Gennes (S.Y. and P.P.), the Direction Générale pour l'Armement (M.R.) and the China Scholarship Council (S.Z.). We also thank Eszter Kozma, Qian Wang and Damien Baigl for critical review of the manuscript. **Author contributions** S.Z., M.R., S.Y., P.P.: conceived and designed experiments M.R., S.Z., S.Y.; performed experiments and analyzed data S.C.; provided technical support in molecular biology S.Z., S.Y., P.P.; wrote the manuscript

- Fehrentz T, Schonberger M, & Trauner D (2011) Optochemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl* 50(51):12156-12182.
- Szobota S & Isacoff EY (2010) Optical control of neuronal activity. *Annu Rev Biophys* 39:329-348.
- Wyart C, et al. (2009) Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461(7262):407-410.
- Levitz J, et al. (2013) Optical control of metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 16(4):507-516.
- Palma-Cerda F, et al. (2012) New caged neurotransmitter analogs selective for glutamate receptor sub-types based on methoxynitroindoline and nitrophenylethoxycarbonyl caging groups. *Neuropharmacology* 63(4):624-634.
- Rodriguez-Moreno A, et al. (2011) Presynaptic induction and expression of timing-dependent long-term depression demonstrated by compartment-specific photorelease of a use-dependent NMDA receptor antagonist. *J Neurosci* 31(23):8564-8569.
- Volgraf M, et al. (2007) Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J Am Chem Soc* 129(2):260-261.
- Volgraf M, et al. (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* 2(1):47-52.
- Janovjak H, Szobota S, Wyart C, Trauner D, & Isacoff EY (2010) A light-gated, potassium-selective glutamate receptor for the optical inhibition of neuronal firing. *Nat Neurosci* 13(8):1027-1032.
- Liu CC & Schultz PG (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem* 79:413-444.
- Davis L & Chin JW (2012) Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(3):168-182.
- Wang L, Brock A, Herberich B, & Schultz PG (2001) Expanding the genetic code of *Escherichia coli*. *Science* 292(5516):498-500.
- Ye S, Riou M, Carvalho S, & Paoletti P (2013) Expanding the genetic code in *Xenopus laevis* oocytes. *Chembiochem* 14(2):230-235.
- Paoletti P, Bellone C, & Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14(6):383-400.
- Hansen KB, Furukawa H, & Traynelis SF (2010) Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol Pharmacol* 78(4):535-549.
- Farina AN, et al. (2011) Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *J Neurosci* 31(10):3565-3579.
- Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, & Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459(7247):703-707.
- Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, & Traynelis SF (2009) Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J Neurosci* 29(39):12045-12058.
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, & Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30(15):3134-3146.
- Zhu S, Stroebel D, Yao CA, Taly A, & Paoletti P (2013) Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 20(4):477-485.
- Karakas E, Simorowski N, & Furukawa H (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475(7355):249-253.
- Masuko T, et al. (1999) A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55(6):957-969.
- Karakas E, Simorowski N, & Furukawa H (2009) Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J* 28(24):3910-3920.
- Karlin A & Akabas MH (1998) Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol* 293:123-145.
- Mayer ML (2011) Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function. *Structure* 19(10):1370-1380.
- Lee CH & Gouaux E (2011) Amino terminal domains of the NMDA receptor are organized as local heterodimers. *PLoS One* 6(4):e19180.
- Reddington SC, et al. (2013) Different photochemical events of a genetically encoded phenyl azide define and modulate GFP fluorescence. *Angew Chem Int Ed Engl* 52(23):5974-5977.
- Burger PB, et al. (2012) Mapping the Binding of GluN2B-selective NMDA Receptor Negative Allosteric Modulators. *Mol Pharmacol* 82(2):344-359.
- Sukumaran M, et al. (2011) Dynamics and allosteric potential of the AMPA receptor N-terminal domain. *EMBO J* 30(5):972-982.
- Sato S, et al. (2011) Crystallographic study of a site-specifically cross-linked protein complex with a genetically incorporated photoreactive amino acid. *Biochemistry* 50(2):250-257.
- Grunbeck A, Huber T, & Sakmar TP (2013) Mapping a ligand binding site using genetically encoded photoactivatable crosslinkers. *Methods Enzymol* 520:307-322.
- Knowles JR (1972) Photogenerated Reagents for Biological Receptor-Site Labeling. *Accounts Chem Res* 5(4):155-160.
- Ye S, et al. (2010) Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature* 464(7293):1386-1389.
- Huber T, Naganathan S, Tian H, Ye S, & Sakmar TP (2013) Unnatural amino acid mutagenesis of GPCRs using amber codon suppression and bioorthogonal labeling. *Methods Enzymol* 520:281-305.
- Dougherty DA (2000) Unnatural amino acids as probes of protein structure and function. *Curr Opin Chem Biol* 4(6):645-652.
- Gautier A, Deiters A, & Chin JW (2011) Light-activated kinases enable temporal dissection of signaling networks in living cells. *J Am Chem Soc* 133(7):2124-2127.
- Miller JC, Silverman SK, England PM, Dougherty DA, & Lester HA (1998) Flash decaging of tyrosine sidechains in an ion channel. *Neuron* 20(4):619-624.
- England PM, Lester HA, Davidson N, & Dougherty DA (1997) Site-specific, photochemical proteolysis applied to ion channels in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):11025-11030.
- Sobolevsky AI, Rosconi MR, & Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462(7274):745-756.

2.2.3. Supplément d'informations

Genetically encoding a light-switch in an ionotropic glutamate receptor reveals subunit-specific interfaces

Shujia Zhu[&], Morgane Riou[&], Stéphanie Carvalho, Pierre Paoletti* and Shixin Ye*

& equally contributing authors, * co-last authors.

Correspondence should be addressed to: pierre.paoletti@ens.fr or yelehman@biologie.ens.fr

Supplementary information includes:

SI Materials and Methods

Supplementary Figures 1–8

SI Materials and Methods

Molecular biology and plasmid construction

Plasmid pSVB.Yam carrying the gene encoding the amber suppressor tRNA derived from *B. stearothermophilus* Tyr-tRNA_{CUA}, and the aminoacyl-tRNA synthetases (aaRS) construction for AzF and Bpa derived from *E. coli* TyrRS have been previously described (1, 2). The pcDNA3-based expression plasmids for rat GluN1-1a (named GluN1 herein), rat GluN2A and mouse ϵ 2 (named GluN2B herein) subunits and sequencing procedure have been described previously (3, 4). Chimeras with exchanged NTDs, GluN2A-2B(NTD), GluN2A-2B(NTD+L), GluN2B-2A(NTD) and GluN2B-2A(NTD+L), were obtained as described in (5). The site-direct amino acid or amber stop codon mutations were introduced into GluN1 or GluN2 by using the Quikchange mutagenesis strategy (Stratagene, La Jolla, CA). Chimeras with exchanged upper lobes or interfaces, Glu2A-2BUL and GluN2A-2BUL-loop) were obtained by a modified protocol of the Quikchange mutagenesis. GluN2A-2BUL represents DNA fragments of GluN2A M1-S142 and Y286-P359 replaced with GluN2B M1-S141 and Y287-P360. GluN2A-2BUL-loop construct was generated based on the GluN2A-2BUL with additional DNA fragment of GluN2A₋₂₀₅TFSED replaced with GluN2B₋₂₀₈MSLDDGD.

Plasmid DNA co-injections and UAA incubation

Oocytes were prepared and injected as described previously (4). Recombinant NMDARs were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after nuclear injection of 36 nl of a mixture cDNAs encoding various GluN1 and GluN2 subunits (ratio 1:1, 10 ng/ μ l for GluN2A and 30 ng/ μ l for GluN2B). For UAA incorporation, oocytes were co-injected with a 36 nl mixture of cDNAs containing GluN1, GluN2, Yam, and aaRS as follows, unless otherwise indicated in the text: GluN1-Y109amb (40 ng/ μ l), GluN2A wt (40 ng/ μ l), Yam (10 ng/ μ l), AzFRS (2 ng/ μ l); or, GluN1-Y109amb (60 ng/ μ l), GluN2B wt (60 ng/ μ l), Yam (10 ng/ μ l), and BpaRS (10 ng/ μ l) or AzFRS (2 ng/ μ l). After injection, oocytes were incubated at 19°C in a Barth solution supplemented with gentamicin sulfate (50 ng/ml) and D-APV (50 μ M). AzF was dissolved with sonication in Barth solution (stock: 10 mM), and diluted (2 mM) for oocytes incubation. Bpa was dissolved in ddH₂O (200 mM) by adding equal molar of NaOH, and subsequently diluted (1 mM) in Barth solution (6).

Electrophysiology

For two-electrode voltage clamp recordings, the standard external solution contained (in mM): 100 NaCl, 0.3 BaCl₂, 5 HEPES and 2.5 KOH. The pH was adjusted to 7.3 with NaOH. NMDAR-mediated currents were induced by simultaneous application of saturating L-glutamate and glycine at the concentrations of 100 μ M each. The heavy-metal chelator diethylenetriamine-pentaacetic acid (DTPA; 10 μ M) was supplemented to all bath solutions, except those for the zinc dose-response curve (DRC)

experiments, to avoid inhibition by contaminant zinc (4). Unless otherwise noted, recordings were performed at a holding potential of -60 mV and at room temperature. Data were collected and analyzed using pClamp 10 (Molecular Devices) and fitted by using SigmaPlot 10.0 (SSPS) or Kaleidagraph. Error bars represent the SD. of the mean value of the relative currents.

MK-801 inhibition

The MK-801 inhibition kinetics are commonly used to index relative (not absolute) P_o (7). MK-801 (Ascent Scientific) was dissolved in distilled water and prepared as 50 μ M stock aliquots. MK-801 solutions were directly diluted from the stock into the full-agonist solution at the final concentration of 10 nM for GluN2A- or 50 nM for GluN2B-containing receptors. Once exposed to MK-801, the oocytes were not used for other assays. The inhibition time constants (τ_{on}) were obtained by fitting currents with a single-exponential component within a time window corresponding to 10-90% of the maximal inhibition. Each τ_{on} was normalized to the mean τ_{on} value obtained on wild-type receptors measured the same day.

Sensitivity to agonist and allosteric modulators

Glycine and glutamate DRC experiments were performed as previously described (7). Ifenprodil (generous gift from Synthelabo, France) was prepared as 10 mM stock aliquots (in 1% HCl). Zinc was prepared at 100 mM $ZnCl_2$ stock (in 1% HCl); Ifenprodil and zinc DRC were obtained and analyzed as described earlier (7).

MTS binding

MTS reagents (2-aminoethylmethanethiosulphonatehydrobromide [MTSEA], 2-(trimethylammonium)-ethylmethanethiosulphonatebromide [MTSET], 3-(triethylammonium)propylmethanethiosulphonatebromide [MTS-PtrEA] and 2-sulfonatoethylmethanethiosulfonatesodium [MTSES]) was purchased from Toronto Research Chemicals, were dissolved in distilled water as 40 mM stock solution and stored at -20°C, and were used as previously described (5, 8). Final MTSEA (2-aminoethyl-methanethio-sulphonate-hydrobromide) solution was prepared at 200 μ M concentration by immediately diluting the stock aliquots into the full-agonist solutions, and used up in less than 30 min. MTS-induced inhibition were defined as the ratio of the agonist-activated current measured after washing of the MTS divided by the current measured before MTS application.

Redox treatment

To induce disulfide-bridge cleavage, oocytes were incubated for 15 min with DTE (dithioerythritol, 5 mM) in a Barth solution (pH 8.0) supplemented with gentamycin and D-AP5. The redox treatments on whole oocytes were performed 'offline' (on non-impaled oocytes).

Immunoblotting

Sample preparation, SDS-PAGE and immunoblotting were performed as previously described (8). The following antibodies were used: anti-GluN1 antibody (1:1,000, mouse monoclonal MAB1586 clone R1JHL; Millipore), anti-GluN2A antibody (1:500, rabbit monoclonal A12W; Millipore), anti-GluN2B antibody (1:500, mouse monoclonal 610416 clone 13; BD Transduction Laboratories), and secondary goat peroxidase-conjugated anti-mouse antibody (1:20,000, Jackson ImmunoResearch, cat. no. 115-035-003). In some cases, anti-GluN1 antibody (1:1000, mouse monoclonal MAB363 clone 54.1, Millipore) was also used as indicated in the figure legend.

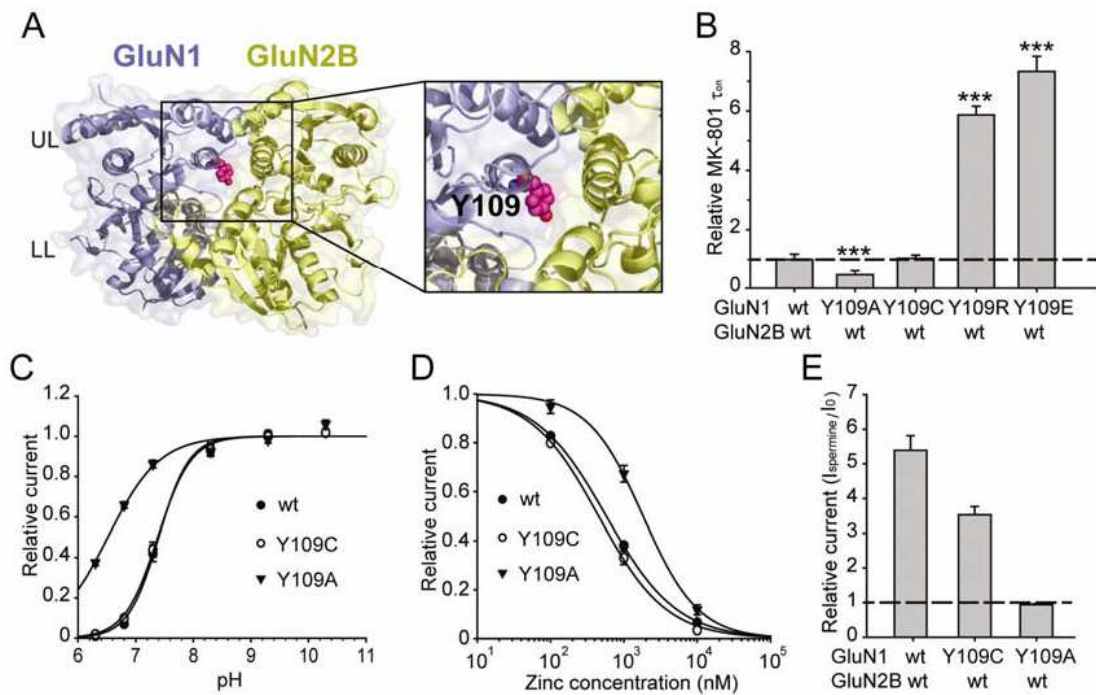


Fig. S1. GluN1-Y109 mutants alter both receptor channel activity and pharmacology.

(A) X-ray crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD dimer (pdb code: 3QEL; Ref 9). The GluN1 subunit is colored in light blue, and GluN2B subunit in yellow. Zoom up view of the UL/UL interface. Residue GluN1-Y109 is highlighted in purple spheres. (B) Relative inhibition kinetics by 50 nM MK-801 of receptors incorporating wild-type (wt) GluN2B subunits and GluN1 wt (1.0 ± 0.1 , $n=19$), GluN1-Y109A (0.44 ± 0.06 , $n=6$), GluN1-Y109C (1.04 ± 0.11 , $n=3$), GluN1-Y109R (5.87 ± 0.29 , $n=3$), GluN1-Y109E (7.33 ± 0.51 , $n=4$). $***P < 0.001$, Student's *t*-test. (C) Proton sensitivity of GluN2B receptors containing wild-type or mutant GluN1 subunits. Values of $\text{pH}_{\text{IC}_{50}}$ and n_{H} are: 7.40 ± 0.03 and 1.6 for GluN1 wt ($n=3$), 7.38 ± 0.02 and 1.5 for GluN1-Y109C ($n=2$), 6.52 ± 0.06 and 1.0 for GluN1-Y109A ($n=3$). (D) Zinc dose-response curves of GluN2B receptors incorporating wild-type or mutant GluN1 subunits. IC_{50} (nM) and n_{H} are: 576 and 0.9 for GluN1 wt, 452 and 0.9 for GluN1-Y109C, 1829 and 1.2 for GluN1-Y109A. Maximum inhibition was fixed as 1. $n=3-4$ for each group. (E) $100 \mu\text{M}$ spermine potentiation of GluN2B receptors incorporating wild-type or mutant GluN1 subunits (experiments done at extracellular pH 6.6). Values of current potentiation are: 5.38 ± 0.42 for GluN1wt, 3.53 ± 0.24 for GluN1-Y109C, 0.94 ± 0.03 for GluN1-Y109A. $n=3$ for each group. Error bars represent the S.D.

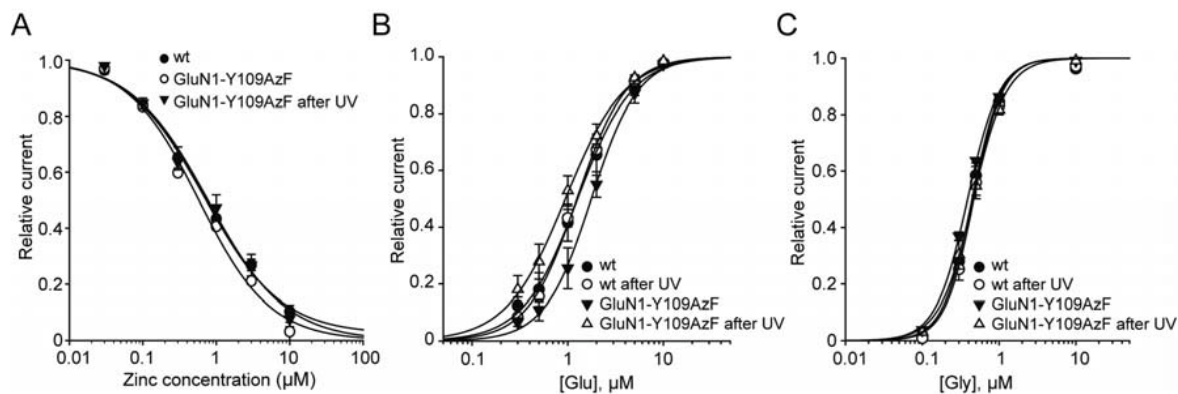


Fig. S2. Pharmacological characterization of the GluN1-Y109AzF incorporated receptors.

(A) Zinc dose-response curves for wild-type (wt) GluN1/GluN2B receptors ($IC_{50} = 0.68 \mu\text{M}$, $n_H = 0.83$, and $Inhibition_{max} = 0.98$), GluN1-Y109AzF/GluN2B wt receptors before ($IC_{50} = 0.58 \mu\text{M}$, $n_H = 0.89$, and $Inhibition_{max} = 1.00$) and after ($IC_{50} = 0.77 \mu\text{M}$, $n_H = 0.82$, and $Inhibition_{max} = 0.98$) UV treatment. $n=3-4$ for each group. (B) Glutamate dose-response curves for wt GluN1/GluN2B receptors before ($EC_{50} = 1.27 \mu\text{M}$, $n_H = 1.52$) and after UV ($EC_{50} = 1.24 \mu\text{M}$, $n_H = 1.69$); for GluN1-Y109AzF/GluN2B wt receptors before ($EC_{50} = 1.77 \mu\text{M}$, $n_H = 1.78$) and after ($EC_{50} = 0.96 \mu\text{M}$, $n_H = 1.40$) UV treatment. $n=3$ for each group. (C) Glycine dose-response curves for wt GluN1/GluN2B receptors before ($EC_{50} = 0.44 \mu\text{M}$, $n_H = 2.3$) and after UV ($EC_{50} = 0.47 \mu\text{M}$, $n_H = 2.3$); for the GluN1-Y109AzF/GluN2B wt receptors before ($EC_{50} = 0.39 \mu\text{M}$, $n_H = 2.1$) and after ($EC_{50} = 0.46 \mu\text{M}$, $n_H = 2.00$) UV treatment. $n = 3-4$ for each group.

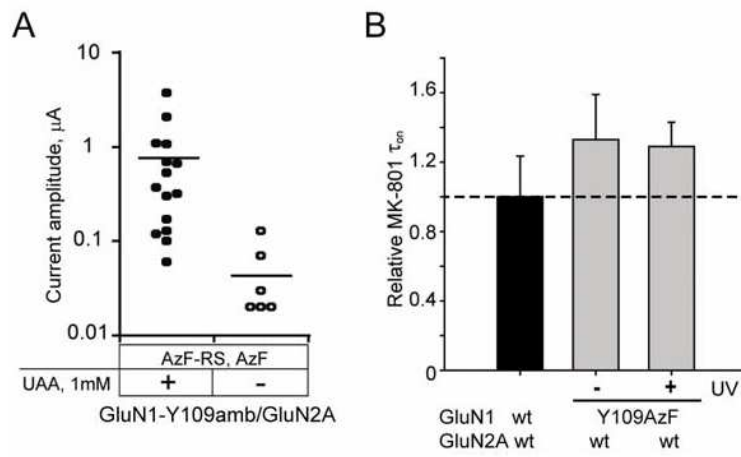


Fig. S3. Genetically encoding AzF in GluN1/GluN2A receptors

(A) Representative dot plot of the current amplitudes from oocytes injected with plasmids encoding GluN1-Y109amb (40 ng/ μ l), GluN2A-wt (40 ng/ μ l), Yam suppressor tRNA (5 ng/ μ l), and AzF-RS (1ng/ μ l) in the absence (empty circles) or presence (solid circles) of the UAA in the incubation media. For each condition, 20 oocytes were tested. Only currents >10 nA were plotted. (B) Relative inhibition kinetics by 10 nM MK-801 applied to oocytes expressing wild-type (wt) GluN1/GluN2A receptors (1.00 ± 0.24), GluN1-Y109AzF/GluN2A before (1.33 ± 0.26) and after (1.29 ± 0.14) UV treatment. $n=3$ for each group. Error bars represent the S.D.

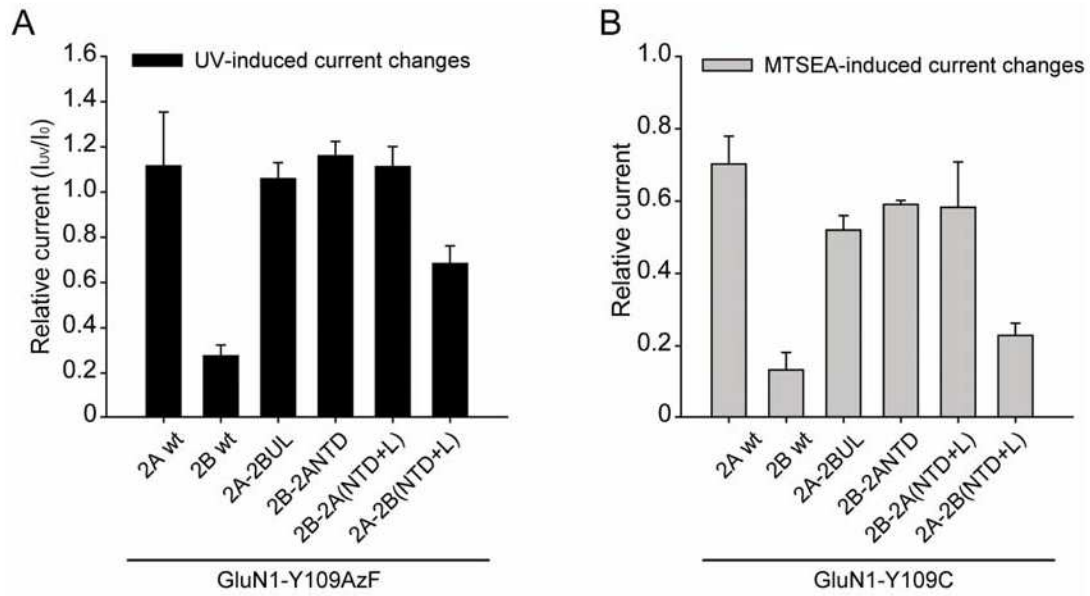


Fig. S4. Modulating UV- and chemical-induced receptor alterations by GluN2A and GluN2B NTD chimeras

(A) UV modification of current carried by receptors containing GluN1-Y109AzF subunits and GluN2A wt (1.12 ± 0.24), GluN2B (0.28 ± 0.05), GluN2A-2BUL (1.06 ± 0.07), GluN2B-2ANTD (1.16 ± 0.06), GluN2B-2A(NTD+L) (1.11 ± 0.09) or GluN2A-2B(NTD+L) (0.68 ± 0.08). $n=3-16$ for each group. (B) MTSEA modification at GluN1-Y109C receptors containing various GluN2 subunits. Values are: GluN2A wt (0.70 ± 0.08), GluN2B wt (0.13 ± 0.05), GluN2A-2BUL (0.52 ± 0.04), GluN2B-2ANTD (0.59 ± 0.01), GluN2B-2A(NTD+L) (0.58 ± 0.13), GluN2A-2B(NTD+L) (0.23 ± 0.03). $n = 3-12$ for each group. Error bars represent the S.D.

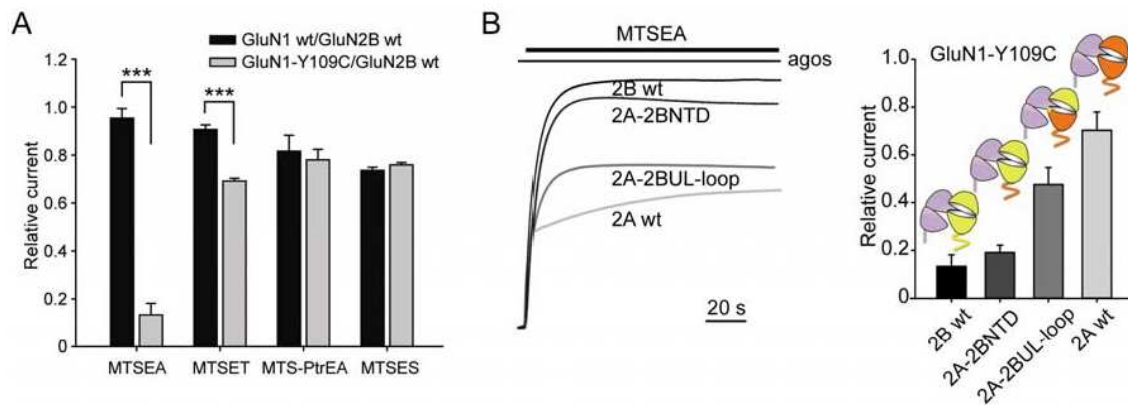


Fig. S5. Subunit specific changes in receptor activity induced by MTSEA binding to the GluN1-Y109C mutant.

(A) MTS reagent current modifications at GluN2B receptors containing either wild-type (wt) GluN1 or GluN1-Y109C mutant subunits. Values from left to right are: 0.95 ± 0.04 , 0.13 ± 0.05 for MTSEA; 0.91 ± 0.02 , 0.69 ± 0.01 for MTSET; 0.82 ± 0.07 , 0.78 ± 0.04 for MTS-PtrEA, 0.74 ± 0.01 , 0.76 ± 0.01 for MTSES. $n=3-8$ for each group.

(B) Left panel: UV modification of current carried by receptors containing GluN1-Y109C subunits and GluN2A wt (1.12 ± 0.24), GluN2B (0.28 ± 0.05), GluN2A-2BUL (1.06 ± 0.07), GluN2B-2ANTD (1.16 ± 0.06), GluN2B-2A(NTD+L) (1.11 ± 0.09) or GluN2A-2B(NTD+L) (0.68 ± 0.08). $n=3-16$ for each group. Right panel: MTSEA modification at GluN1-Y109C receptors containing various GluN2 subunits. Values are: GluN2A wt (0.70 ± 0.08), GluN2B wt (0.13 ± 0.05), GluN2A-2BUL (0.52 ± 0.04), GluN2B-2ANTD (0.59 ± 0.01), GluN2B-2A(NTD+L) (0.58 ± 0.13), GluN2A-2B(NTD+L) (0.23 ± 0.03). $n = 3-12$ for each group. Error bars represent the S.D. *** $P < 0.001$, Student's *t*-test.

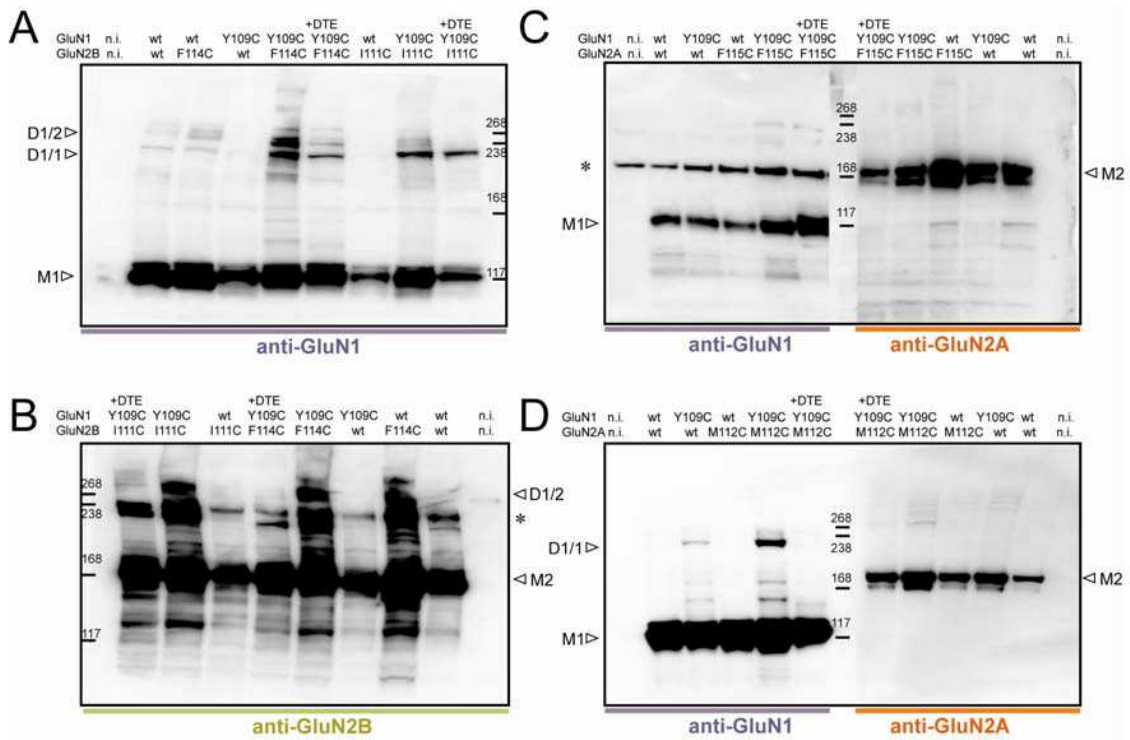


Fig. S6. Differential NTD UL/UL interface in GluN2A and GluN2B containing receptors.

(A,B) Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wt or mutant GluN1 and GluN2B subunits detected by anti-GluN1 (blue) or anti-GluN2B (yellow) antibodies. M1 indicates the expected band location of the GluN1 monomer (~110 kDa); M2 indicates the expected band location of the GluN2B monomer (~180 kDa); D1/2 indicates the expected band location of the GluN1/GluN2B heterodimer (~290 kDa); D1/1 indicates the expected band location of the GluN1 homodimer (~220 kDa). * indicates a non-specific band. n.i. indicates non-injected oocytes. Treatment with the reducing reagent DTE is also marked (+DTE). (C,D) Immunoblots from *Xenopus* oocytes expressing either wild-type (wt) or mutant GluN1 and wt or mutant GluN2A subunits detected by anti-GluN1 (blue) or anti-GluN2A (orange) antibodies. M1 indicates the expected band location of the GluN1 monomer (~110 kDa); M2 indicates the expected band location of the GluN2A monomer (~180 kDa); D1/1 indicates the expected band location of the GluN1 homodimer (~220 kDa). The anti-GluN1 antibodies MAB363 and MAB1586 were used in (a) and (b), respectively.

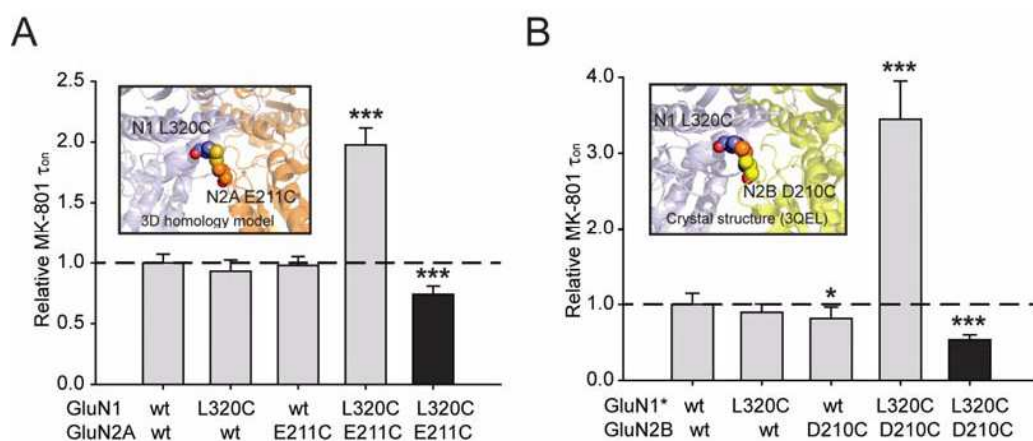


Fig. S8. Engineering a disulfide bond at the GluN1 UL/GluN2 LL NTD dimer interface affects receptor activity

(A). Relative inhibition kinetics by 10 nM MK-801 of receptors incorporating wild-type (wt) or cysteine mutant subunits. Inset: Close-up view of the GluN1 UL/GluN2A LL NTD heterodimer interface as obtained by homology modeling based on the crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD heterodimer (pdb code: 3QEL; Ref 9). The two introduced cysteines, GluN1-L320C (in blue) and GluN2A-E211C (in orange) are shown in spheres. The mean values are, from left to right: 1.00 ± 0.06 (n=9), 0.93 ± 0.09 (n=6), 0.98 ± 0.07 (n=6), and the double-cysteine receptors before, 1.98 ± 0.14 (n=9), and after DTE treatment (black bar), 0.74 ± 0.07 (n=6). ***P<0.001, Student's t-test. (B). Relative inhibition kinetics by 50 nM MK-801 of receptors incorporating wt or cysteine mutant subunits. GluN1* represents the GluN1 C744A-C798A double mutant subunit (see Ref 7). Inset: Close-up view of the GluN1 UL/GluN2B LL NTD heterodimer interface as seen in the crystal structure of the GluN1/GluN2B NTD heterodimer (pdb code: 3QEL; Ref 9). The two introduced cysteines, GluN1-L320C (in blue) and GluN2B-D210C (in yellow) are indicated in sphere. The mean values are, from left to right: 1.00 ± 0.12 (n=9), 0.89 ± 0.11 (n=7), 0.81 ± 0.15 (n=10), and the double cysteine containing receptors before, 3.45 ± 0.50 (n=6), and after 0.53 ± 0.06 (n=5) DTE treatment (black bar). *P<0.05, ***p<0.001, Student's t-test.

References

1. Ye S, *et al.* (2008) Site-specific incorporation of keto amino acids into functional G protein-coupled receptors using unnatural amino acid mutagenesis. *J Biol Chem* 283(3):1525-1533.
2. Ye S, Huber T, Vogel R, & Sakmar TP (2009) FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nat Chem Biol* 5(6):397-399.
3. Paoletti P, Ascher P, & Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17(15):5711-5725.
4. Gielen M, *et al.* (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57(1):80-93.
5. Gielen M, Siegler Retchless B, Mony L, Johnson JW, & Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459(7247):703-707.

6. Ye S, Riou M, Carvalho S, & Paoletti P (2013) Expanding the genetic code in *Xenopus laevis* oocytes. *Chembiochem* 14(2):230-235.
7. Zhu, S, Stroebel, D, Yao, CA, Taly, A & Paoletti, P (2013) Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 20 (4), 477-485.
8. Mony L, Zhu S, Carvalho S, & Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30(15):3134-3146.
9. Karakas, E, Simorowski, N & Furukawa, H (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475(7355), 249-253.

2.2.4. Discussion

2.2.4.1. Conclusions de l'étude et perspectives

Principaux résultats

Cette étude a confirmé qu'il était possible d'incorporer un acide-aminé non-naturel photo-activable dans un rNDMA et que cet UAA (l'AzF), une fois excité par la lumière UV, était capable d'interagir avec un résidu endogène du récepteur. Par une exposition prolongée des ovocytes aux UVs, nous sommes en effet parvenus à photo-inactiver un rNDMA de type GluN1/GluN2B, c'est-à-dire à contrôler par la lumière l'activité d'un récepteur-canal. Nous avons donc créé un récepteur-canal de type NMDA photo-sensible, d'une manière tout à fait inédite puisqu'elle repose sur l'expansion du code génétique dans des ovocytes de *Xénope*.

La caractérisation de cette photo-inactivation et des propriétés fonctionnelles des récepteurs photo-inactivés suggère l'existence d'un photo-pontage intra-sous-unités, entre l'AzF109 et un résidu d'une boucle flexible de GluN1. D'après la structure cristallographique du NTD de GluN1 dans le dimère GluN1/GluN2NB (Fig. 2.2.1 ; Karakas et al., 2011), l'isoleucine I133 est le résidu le mieux placé et le mieux orienté pour interagir avec l'AzF. Par des mutations supplémentaires à l'interface "lobe supérieur (UL) de GluN1 / lobe inférieur (LL) de GluN2B" (mutagenèse dirigée classique), nous avons apporté des arguments en faveur de l'hypothèse selon laquelle les contraintes exercées sur cette boucle par le pontage stabiliserait l'interface de dimérisation entre le lobe supérieur du NTD de GluN1 et le lobe inférieur de GluN2. Nous avons montré par une approche biochimique que cette interface "GluN1-UL/GluN2-LL", était présente à la fois dans les récepteurs contenant GluN2B et ceux contenant GluN2A. Cependant, dans le cas de GluN1/GluN2A, cette interface n'est pas stabilisée par des contacts électrostatiques, contrairement à ce que l'on observe pour les récepteurs GluN1/GluN2B. Ces contraintes moins fortes exercées sur les NTDs des récepteurs GluN1/GluN2A peuvent expliquer pourquoi ces récepteurs ne sont pas photo-inactivés. Ces différences structurales du dimère de NTDs entre les deux sous-types de récepteurs sont aussi

probablement impliquées dans la spécificité de la modulation allostérique des rNMDAs par des ligands des NTDs. Enfin, nous avons également mis en évidence des disparités entre récepteurs GluN1/GluN2A et récepteurs GluN1/GluN2B, au niveau de l'interface UL/UL de dimérisation des NTDs de GluN1 et GluN2. En effet, l'interface UL/UL entre les NTDs de GluN1 et GluN2A définit un dimère moins compact que dans le cas des NTDs de GluN1 et GluN2B.

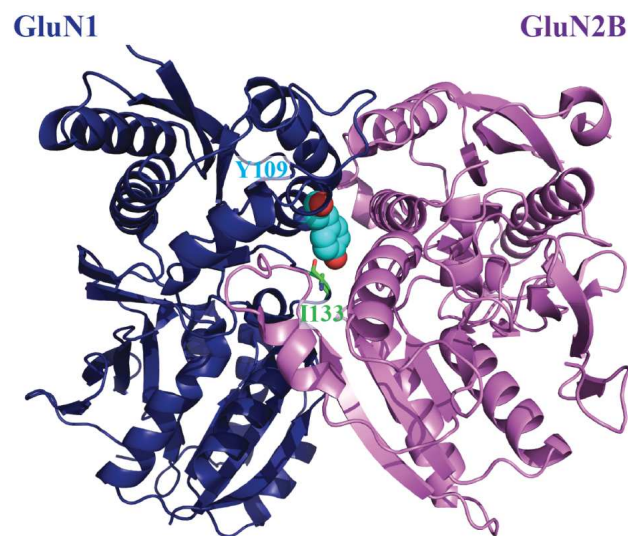


Figure 2.2.1. Le résidu GluN1-Y109 occupe une position clé, à l'interface entre les NTDs de GluN1 et GluN2B. Structure cristallographique du dimère de NTDs de GluN1 (bleu) et GluN2B (rose) (pdb 3QEL, Karakas et al., 2009). Le résidu GluN1-Y109 est représenté par des sphères bleues. Sa chaîne latérale est dirigée vers une petite boucle du lobe supérieur du NTD de GluN1, contenant notamment le résidu I133, représenté par des sticks verts. Cette structure diffère de celles des dimères de NTDs AMPA et kainate, qui sont des structures beaucoup plus rigides (interfaces UL/UL et LL/LL)

Assemblage des NTDs

Cet arrangement si particulier des NTDs au sein des dimères GluN1/GluN2B (structure cristallographique) et GluN1/GluN2A (études fonctionnelles), de même que la conformation "twistée" des NTDs (voir Introduction 2.2.6), sont en faveur d'un arrangement des NTDs, au

sein d'un rNMDA tétramérique, différent de celui des rAMPA et rKAs. En effet, dans les structures de tétramères de NTDs dont on dispose, celle d'un rKA hétérotétramérique GluK2/GluK5 (Kumar et al., 2011) et celle du rAMPA-GluA2 homomérique (Sobolevsky et al., 2009), les deux dimères interagissent via les lobes inférieurs des NTDs des sous-unités internes. Dans le cas des rNMDAs, les caractéristiques structurales des monomères et des hétérodimères sont incompatibles avec un tel arrangement. Il est au contraire plus probable que les lobes supérieurs des NTDs forment l'interface dimère-dimère. C'est ce que proposent E.Karakas, N.Simorowski et H.Furukawa, avec la structure cristallographique d'un tétramère de NTDs GluN1/GluN2B, qui met en évidence un arrangement asymétrique des NTDs, avec les sous-unités GluN1 externes et les sous-unités GluN2B internes (Fig. 2.2.2). Ce sont ces sous-unités qui forment l'interface de tétramérisation par l'intermédiaire d'interactions entre leurs lobes supérieurs. Cet arrangement "tête à tête" est cohérent avec la flexibilité des lobes inférieurs des NTDs qui est requise pour la modulation allostérique des rNMDAs par des ligands du NTD (Paoletti, 2011 ; Furukawa, 2012). Toutefois il reste à confirmer que cette structure d'un tétramère de NTDs de rNMDA et notamment les contacts entre dimères de NTDs n'est pas un "artéfact" de cristallisation et est bien présente dans un récepteur complet fonctionnel.

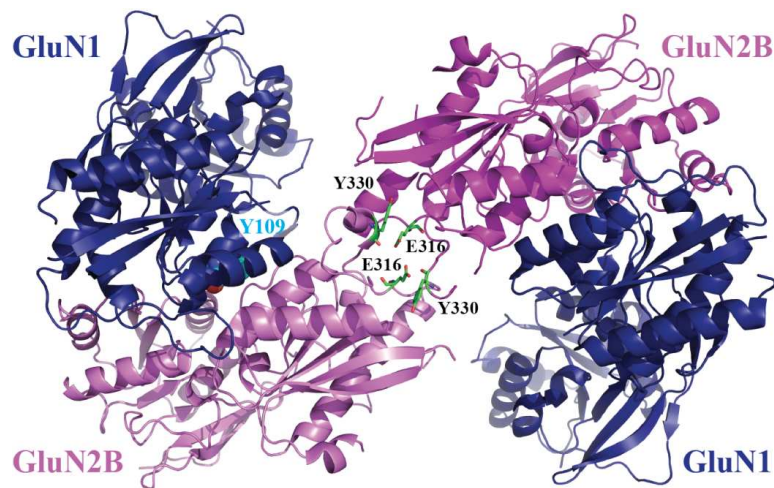


Figure 2.2.2. Dans un tétramère de NTDs GluN1/GluN2B, les sous-unités GluN2B, internes, forment l'interface de tétramérisation. Structure cristallographique d'un tétramère de NTDs de GluN1 (bleu) et GluN2B (rose) (pdb 3QEL, Karakas et al., 2011). Les sous-unités GluN1 sont externes par rapport au pseudo-axe de symétrie, les sous-unités GluN2B sont internes. Les lobes supérieurs des NTDs de GluN2B forment l'interface de tétramérisation. Des résidus de cette interface, GluN2B-E316 et GluN2B-Y330 sont représentés par des sticks verts.

Concernant les rNMDAs de type GluN1/GluN2A, une étude récente basée sur le transfert d'énergie de résonance (FRET) entre des fluorophores accrochés au niveau des lobes supérieurs des NTDs, a suggéré que, dans un rNMDA entier et fonctionnel, les NTDs s'arrangeaient également de façon asymétrique, avec les lobes supérieurs des NTDs des sous-unités GluN2A, internes, qui forment l'interface de tétramérisation (Sirrieh et al., 2013).

L'ensemble de ces études suggèrent donc qu'au niveau de la couche des NTDs, l'arrangement des quatre domaines dans un rNMDA est unique et distinct de celui des autres iGluRs.

Perspectives

De nombreux arguments sont en faveur d'un photo-pontage intra-sous-unités entre l'AzF introduit à la position GluN1-Y109 et un autre résidu de cette même sous-unité. En effet, réalisés à plusieurs reprises sur des homogénats d'ovocytes de *Xénope* exprimant les rNMDAs GluN1wt/GluN2B-Y109AzF, avant et après exposition aux UVs, les western-blots n'ont révélé aucun hétérodimère GluN1/GluN2B dans le cas des récepteurs pré-exposés aux UVs. Cela suggère que la sous-unité GluN2B n'est pas impliquée dans le photo-pontage. Par ailleurs, une étude approfondie de la structure cristallographique de GluN1 dans le dimère GluN1/GluN2B a mis en évidence une petite boucle de résidus proches de Y109, en particulier l'isoleucine 133 dont la chaîne latérale pointe vers la position Y109. Nous avons évalué le rôle de I133 dans le photo-pontage de l'AzF en partant de l'hypothèse selon laquelle raccourcir la chaîne latérale du partenaire potentiel (I133) en le mutant en alanine par exemple, empêche l'AzF de réagir avec lui. D'un point de vue fonctionnel, cela devrait se traduire par l'absence d'inhibition du rNMDA GluN1-Y109AzF-I133A/GluN2Bwt après l'application d'UV. Effectivement, l'effet de l'UV a totalement disparu ce qui est donc en faveur d'une interaction entre l'AzF et GluN1-I133. Néanmoins, il ne s'agit là que de la preuve indirecte d'un réel photo-pontage. Une façon de déterminer l'existence d'interactions entre l'AzF109 et l'isoleucine I133 serait d'analyser la protéine photo-pontée par spectrométrie de

masse, une technique de détection robuste et sensible qui permet de déterminer des structures moléculaires et donc des interactions inter- et intra-moléculaires.

L'identification de pontages intra-moléculaires par western-blot est difficilement réalisable car cette méthode n'est pas assez sensible pour détecter des changements conformationnels intra-sous-unité. En revanche, la sous-unité GluN1, comme toute protéine, peut être digérée en plusieurs peptides par la trypsine, une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles un acide aminé basique (Lys, Arg) engage sa fonction acide. Or, d'après des travaux réalisés précédemment dans le laboratoire sur des domaines isolés (Perin-Dureau et al., 2002 ; Rachline et al., 2005), il est possible de "cacher" les sites de trypsinolyse. C'est le cas de la liaison du zinc sur le NTD de GluN2A ou de l'ifenprodil sur le NTD de GluN2B, qui protègent les NTDs de la digestion par la trypsine. Si le photo-pontage intra-GluN1 induit bien un changement conformationnel, il est possible qu'il protège aussi de la trypsinolyse. La technique est relativement simple, puisqu'il suffit de mettre les membranes des ovocytes (exprimant les récepteurs GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt ou GluN1wt/GluN2Bwt), isolées et purifiées, en présence de trypsine, puis de stopper la digestion en ajoutant le tampon de charge. Les échantillons sont alors séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, les étapes suivantes étant inchangées, jusqu'à la révélation des membranes par chemoluminescence. Si les sous-unités GluN1-Y109AzF des récepteurs irradiés par les UVs, sont effectivement protégées de la digestion par la trypsine, nous nous attendons à détecter, pour ces récepteurs photo-pontés, des bandes de plus haut poids moléculaire, que celles que nous observerions dans le cas de récepteurs mutants non-irradiés ou de récepteurs de type sauvages. Pour ces récepteurs en effet, nous devrions détecter de nombreuses bandes de faible poids moléculaire, correspondant aux divers produits de dégradation. Néanmoins, contrairement aux travaux précédents, nous travaillons, non pas sur des domaines isolés, mais sur une sous-unité GluN1 entière. Les chances d'observer une différence de poids moléculaire pour la sous-unité GluN1 irradiée sont donc très minces. Si elle est concluante, cette approche fournira tout de même un argument supplémentaire en faveur d'un photo-pontage intra-moléculaire.

2.2.4.2. L'expansion du code génétique, une nouvelle méthode pour obtenir des récepteurs-canaux sensibles à la lumière.

Les méthodes permettant de manipuler les protéines par la lumière ont connu des progrès fulgurants ces dernières années. Le contrôle optique des protéines est en effet une approche attrayante, car la lumière est un outil non-invasif, qui perturbe peu le système d'étude et qui permet un contrôle des protéines à distance. Sa haute résolution spatiale (de l'ordre du micron) et temporelle (de l'ordre de la microseconde) permet en outre d'étudier des processus aux cinétiques rapides et confinés dans des compartiments cellulaires spécifiques.

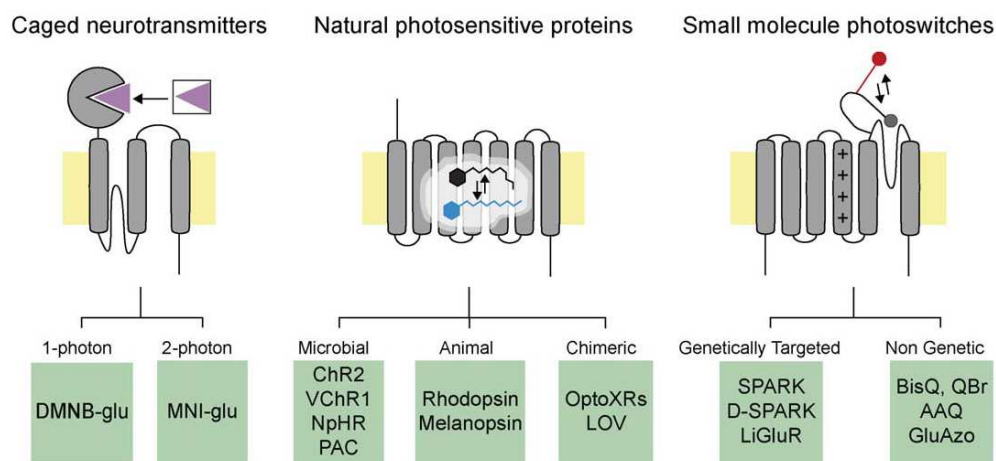


Figure 2.2.3. Différentes approches pour contrôler l'activité neuronale par la lumière. Trois catégories d'outils d'optogénétique sont représentées ici: les molécules cagées (**gauche**), les protéines naturellement photo-sensibles (**centre**) et les petites molécules photo-isomérisables (**droite**). Des exemples de ces outils sont écrits dans les encarts verts. *D'après Kramer et al., 2009*

L'optogénétique, méthode associant génétique et optique et permettant de rendre des cellules sensibles à la lumière, a été utilisée notamment pour étudier les canaux ioniques. Au cours des dernières années sont apparues diverses stratégies, permettant de contrôler optiquement des canaux ioniques (Fig. 2.2.3). Une de ces stratégies repose sur l'utilisation de

composés photo-cagés, qui, une fois photolysés par la lumière (étape irréversible), libèrent des neurotransmetteurs capables d'activer les récepteurs-canaux étudiés (Gautier et al., 2011 ; Miller et al., 1998 ; England et al., 1999). Aussi puissante soit-elle, cette approche présente toutefois des limites : (1) les composés photo-cagés sont diffusibles, et peuvent donc agir en dehors du volume illuminé ; et (2) ils ne sont jamais complètement sélectifs pour une seule protéine-cible. Afin d'y remédier, une des solutions est de contraindre la molécule photosensible et la protéine-cible à rester à proximité. C'est ce que permet l'approche plus récente basée sur l'utilisation de ligands attachés photo-isomérisables ("Photoisomerizable Tethered Ligands" ou PTL), qui contrôlent directement l'activité d'un canal ionique, d'une manière dépendant de la lumière (Fig. **2.2.4.D**)

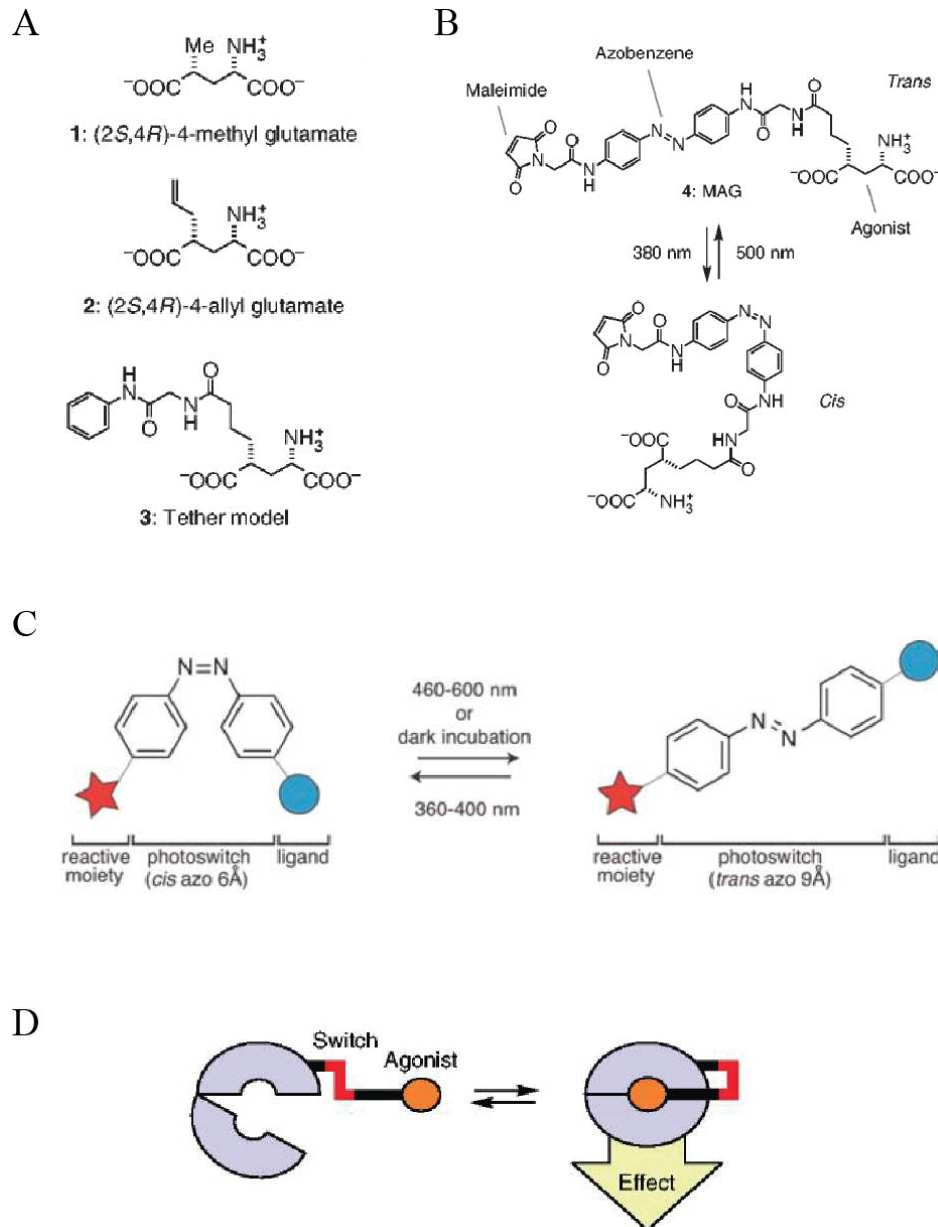


Figure 2.2.4. Stratégie pour obtenir un canal ionique photo-sensible grâce à des molécules photo-convertibles contenant un groupe azobenzène. **A-** Structures chimiques d'agonistes du rKA-GluA2, dont le modèle. **B-** Structure du Maleimide Azobenzene Glutamate (MAG) dans sa configuration *trans* (en lumière visible et obscurité) et *cis* (sous UVs 380 nm). **C.** Isomérisation de l'azobenzène entre ses configurations *cis* et *trans* après application d'UVs. L'étoile rouge représente le groupe réactif qui permettra d'attacher la molécule au récepteur (maleimide par exemple) et le rond bleu représente le ligand. *D'après Fortin et al., 2011.* **D.** Mécanisme aboutissant à la photo-activation ou photo-inactivation d'un récepteur-canal : un agoniste (ou antagoniste, orange) est attaché à l'ABD par l'intermédiaire d'un groupe isomérisable rouge), via des "linkers" (noirs). Le ligand ne peut atteindre le site de liaison que dans une seule configuration. *D'après Volgraf et al., 2006*

Erlanger et ses collègues ont été les premiers à utiliser des composés contenant un groupe azobenzène photo-isomérisable, dans le but de réguler l'activité des récepteurs nicotiques à acétylcholine (nAChRs) (Bartels et al., 1971). Dans leur protocole, le PTL utilisé, le 3-(α -bromométhyl)-3-[α -(triméthylammonium)méthyl]azobenzène bromide (QBr), est attaché de façon covalente à une cystéine endogène préalablement réduite, présente à la surface du nAChR. Une fois attaché, le QBr n'active les nAChRs que dans sa configuration *trans*. La rapidité de l'isomérisation entre les formes *trans* (canal activé) et *cis* (canal inactivé), en limitant la désensibilisation des nAChRs, a permis d'en étudier les cinétiques d'activation avec une grande précision (Lester et al., 1990).

Plus tard, le groupe de E.Y. Isacoff a développé des récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs) activés par la lumière (LiGluR) qui, lorsqu'ils sont introduits dans les neurones, peuvent être contrôlés à distance. Cette approche repose notamment sur la synthèse d'un agoniste photo-sensible (Fig. 2.2.4.B ; PTL pour Photoisomérisable tethered Ligand), composé d'un analogue du glutamate (Fig. 2.2.4.A), d'un azobenzène photo-isomérisable (Fig. 2.2.4.C) et d'un maléimide par l'intermédiaire duquel le PTL pourra être attaché de façon covalente au LiGluR (le PTL est alors désigné par le trigramme MAG). Ce PTL, photo-commutateur de petite taille (de l'ordre du nanomètre) nécessite de substituer un acide-aminé du récepteur par une cystéine pour pouvoir s'y attacher (réaction de conjugaison entre le maléimide et la cystéine). De cette façon, le LiGluR peut être génétiquement adressé aux neurones d'intérêt. L'azobenzène est idéal car il peut photo-isomériser de façon répétitive avec un très bon rendement et sans perte de fluorescence (Renner & Moroder, 2006).

E.T.Isacoff et ses collègues ont donc rendu un récepteur kainate (rKA) de type GluK2 photo-activable, en attachant, en bordure du domaine bilobé de l'ABD, un analogue du glutamate contenant le groupe azobenzène. Lorsqu'il est éclairé à une longueur d'onde de 380 nm, l'azobenzène photo-isomériser en quelques picosecondes de la configuration *trans* à la configuration *cis* (qui diffèrent de 3 Å), ce qui permet au PTL de présenter le glutamate à l'entrée du domaine bilobé. L'agoniste peut alors atteindre son site de liaison, ce qui entraîne la fermeture de l'ABD et donc l'activation du canal (Fig. 2.2.5.A). Exposé à la lumière visible ($\lambda=500$ nm), l'azobenzène reprend sa configuration *trans*, le glutamate se retire et le récepteur est alors désactivé. Ainsi, l'isomérisation réversible de l'azobenzène contrôle l'ouverture et la

fermeture du canal ionique, par l'intermédiaire des mouvements du domaine bilobé des ABDs. Ces LiGluRs, ont d'abord été étudiés dans des cellules HEK293 et des neurones hippocampiques de rat (Fig. 2.2.5.B). Ainsi, lorsque le mutant rKA-GluK2 est exprimé dans des neurones et est étiqueté avec le PTL, la photo-isomérisation vers la forme *cis* induit une dépolarisation et le déclenchement de potentiels d'action (Fig. 2.2.5.B, D et E ; Szobota et al., 2007). Cette méthode a ensuite été appliquée au système nerveux de poissons-zèbres, ce qui a permis de contrôler des comportements, *in vivo* et par la lumière (Fig. 2.2.5.C ; Szobota et al., 2007). Un canal potassique Shaker sensible à la lumière a lui aussi été construit (Banghart et al., 2004), en attachant le PTL maleimide-azobenzène-quaternary ammonium (MAQ) à une cystéine introduite par mutagenèse dirigée à la surface du canal. Le MAQ agit en bloquant la conduction ionique dans sa configuration *trans* uniquement.

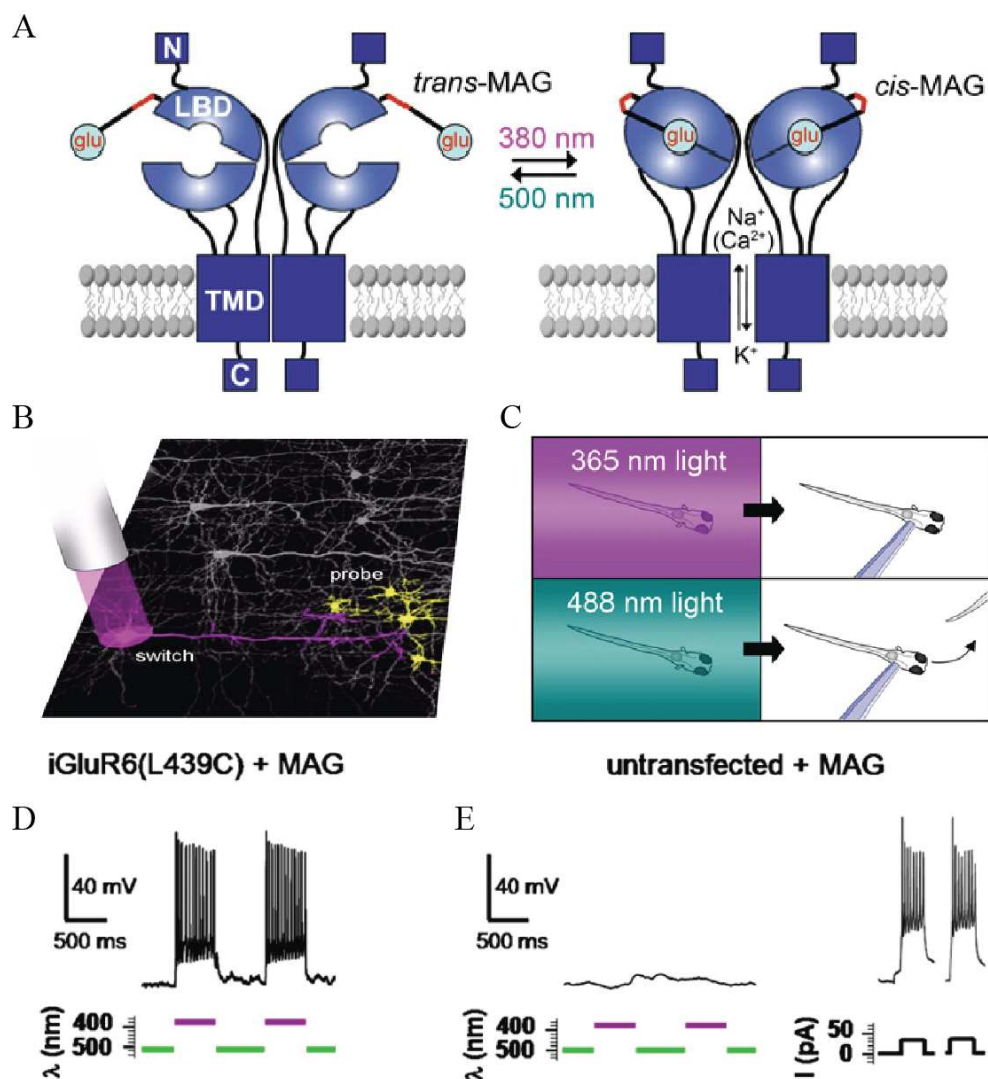


Figure 2.2.5. Contrôle de l'excitabilité neuronale et d'un comportement chez le poisson-zèbre par des récepteurs kainate couplés à des ligands photo-convertibles.. **A.** Le mécanisme d'activation du LiGluR est basé sur la photo-isomérisation de son agoniste MAG, contenant un analogue du glutamate et le groupe isomérisable azobenzène, et attaché au récepteur via le maleimide, qui réagit avec la cystéine introduite dans l'ABD du récepteur. **B.** Combiné à des sondes sensibles au voltage, pour mesurer l'activité neuronale, le LiGluR permet l'analyse des circuits neuronaux grâce au contrôle, non invasif et à distance, de l'activation du canal. **C.** Exprimés *in vivo*, les LiGluRs permettent d'étudier des comportements et d'analyser les circuits neuronaux. Dans les larves de poisson-zèbre, le comportement de fuite induit par le toucher est étudié après activation des LiGluRs (violet) ou leur désactivation (bleu). **D-** L'activation d'un rKA-GluK2-L493C par un MAG après illumination (380 nm) induit une dépolarisation de la membrane post-synaptique qui déclenche des trains de potentiels d'action. Une illumination à la longueur d'onde 500 nm permet la repolarisation de la membrane. **E.** Des neurones non-transfectés ne répondent pas à la lumière mais une injection de courant induit bien des potentiels d'action. *D'après Szobota et al., 2007*

Cette approche d'optogénétique basée sur l'introduction d'un PTL dans une protéine et sa manipulation par la lumière repose en partie sur l'accessibilité de la position où l'on souhaite introduire ce PTL. Il s'agit donc exclusivement de sites extracellulaires. L'utilisation d'UAA photo-réactifs est une méthode nouvelle pour le contrôle optique d'une protéine, permettant de soustraire cette contrainte. Dans notre article, nous avons incorporé un UAA photo-réactif, l'AzF, à une position précise du NTD de GluN1, aboutissant ainsi à un rNMDA photo-sensible, dont l'activité a pu être contrôlée par la lumière. L'expansion du code génétique constitue donc une nouvelle approche permettant d'obtenir des canaux sensibles à la lumière, ou encore des "Light-Sensitive Channels". Toutefois, contrairement au PTL, l'AzF photo-réactif que nous avons incorporé établit une liaison covalente non-réversible : une fois inactivé, le rNMDA "photo-sensible" est donc figé dans cet état. Ainsi, l'AzF ne nous permet pas d'alterner, sous l'action de la lumière, entre deux états du récepteur, ce qui en limite l'intérêt d'une utilisation *in vivo*. Nous envisageons donc plutôt d'incorporer dans le rNMDA un UAA photo-convertible (ou photo-isomérisable), dont la chaîne latérale est un azobenzène. Un tel UAA a déjà été incorporé par extension du code génétique dans *E.coli* (Fig. 2.2.6 ; Bose et al., 2006).

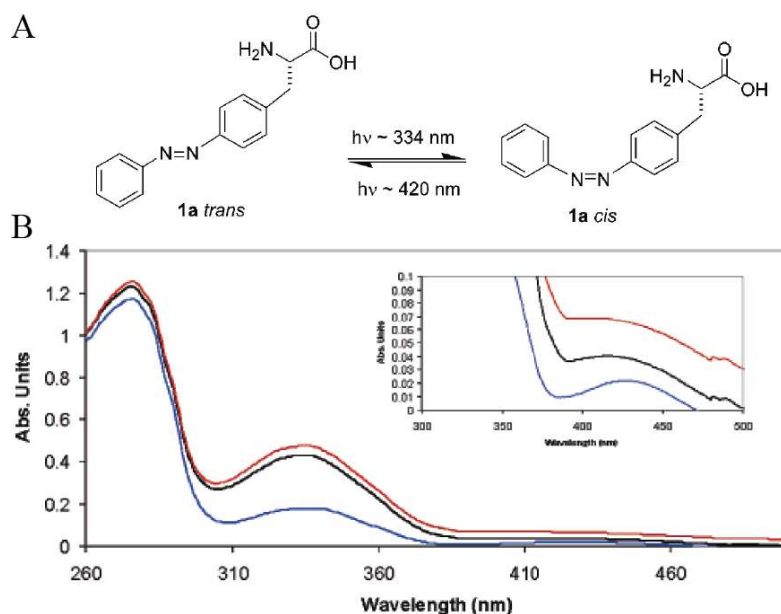


Figure 2.2.6. Photo-isomérisation *cis-trans* de l'acide-aminé non-naturel AzoPhe dans une protéine exprimée dans *E.coli*. **A.** Réaction de photo-isomérisation de l'UAA phenylalanine-4-azobenzène (AzoPhe). **B.** Spectre d'absorption de la protéine activateur de transcription CAP (Catabolite Activator protein) de *E.coli*, ayant incorporé l'AzoPhe. Les pics d'absorbance de la protéine varient selon la longueur d'onde d'irradiation (334 nm (bleu), 420 nm (noir), non irradié (rouge)). D'après Bose et al., 2006.

Notre étude, réalisée en système hétérologue, dans des ovocytes de *Xénope*, permet d'évaluer les relations structure-fonction d'une protéine-cible unique. Il est à présent nécessaire de faire évoluer cette technique vers des systèmes plus natifs afin de pouvoir manipuler sélectivement l'activité d'un récepteur, et ainsi en étudier le rôle, dans un circuit neuronal intact. Notre objectif à présent est donc de pouvoir contrôler un rNMDA directement dans des neurones primaires, en utilisant ces UAAs photo-réactifs encodés génétiquement. En cours de révision du papier, nous avons montré que le récepteur GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt pouvait être photo-inhibé lorsqu'il était exprimé en cellules HEK. Nous sommes actuellement entrain de tester la photo-réactivité de ces récepteurs dans des neurones. Nous devons pour cela faire face à deux contraintes majeure, la première d'entre elles étant liée aux cinétiques lentes de photo-inhibition du rNMDA. En effet, lorsqu'ils sont exprimés en ovocytes de *Xénope*, les récepteurs GluN1-Y109AzF/GluN2Bwt ne sont inactivés qu'après des applications longues d'UVs, supérieures à trois minutes. Dans le cas de neurones, ces longues applications peuvent être préjudiciables car elles risquent de les endommager. L'idéal, afin

d'éviter la mort des neurones, serait de procéder par des applications lumineuses brèves et répétitives ("pulses"). Par ailleurs, l'expression de plusieurs plasmides, quatre au total (ARNt supresseur, aminoacyl-ARNt synthetase et les deux sous-unités du rNMDA dont une est porteur du codon stop ambre) pose de véritables soucis d'efficacité de transfection.

Depuis la soumission de notre papier, un article publié dans *Neuron* (Kang et al., 2013) a montré qu'il était effectivement possible d'exprimer *in vivo*, ici dans des neurones du néocortex d'embryons de souris, un canal potassique à rectification entrante Kir2.1, rendu photo-inductible grâce à l'incorporation d'un UAA, le 4.5-dimethoxy-2-nitrobenzyl-cysteine (Cmn ; Fig. 2.2.7.B), dans le pore du canal. Ce canal PIRK ("Photoinducible Inward-Rectified K⁺ channel") est constitutivement inactif car le Cmn, par sa grande taille (plus gros que le composé photo-cagé traditionnel, le *o*-nitro-benzyl), obstrue le pore. Sous l'effet d'une application d'UV par "pulses", le Cmn est facilement photolysé, libérant ainsi la "cage" c'est-à-dire le groupe dimethoxynitrobenzyl (Fig. 2.2.7.A). Seule la cystéine reste dans le canal, là où le Cmn avait été introduit. Ce clivage enlève donc la contrainte stérique qui rendait le canal non-conducteur : des courants sortant K⁺ sont alors enregistrés (Fig. 2.2.7.C). Dans cet article, J.Y.Kang, L.Wang et leurs collègues ont exprimé ces canaux PIRK successivement dans des cellules HEK293, dans des neurones d'hippocampe de rat en culture puis dans des neurones du néocortex d'embryons de souris (voir Introduction 4.4 pour le protocole détaillé permettant l'expansion du code génétique *in vivo*). Ainsi, des enregistrements en cellule entière sur des tranches de cerveau de ces embryons de souris ont démontré le succès de l'expression de canaux PIRK ayant incorporé l'UAA Cmn *in vivo*. Même si la technique semble lourde (multiples injections et électroporations), les auteurs en ont montré l'efficacité de manière plus générale, en l'appliquant à d'autres régions du cerveau, notamment le diencéphale (incluant le thalamus et l'hypothalamus).

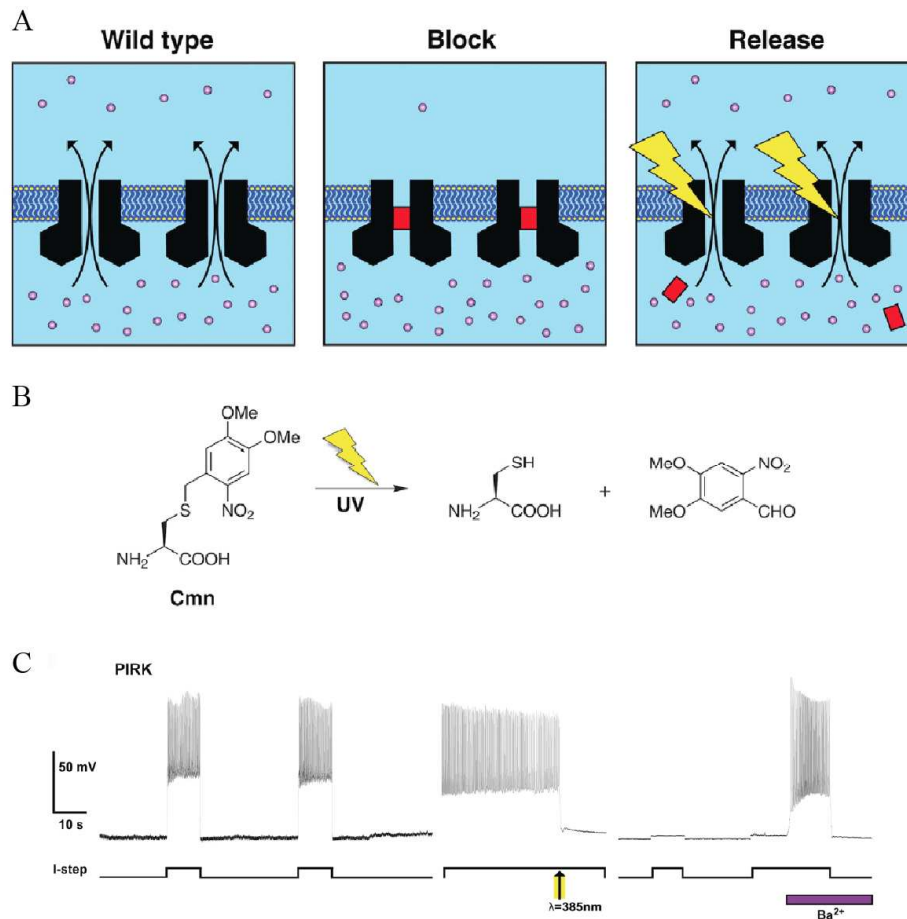


Figure 2.2.7. Création de canaux potassiques sensibles à la lumière par incorporation d'UAAs photo-cagés et applications pour le contrôle de l'excitabilité neuronale. **A.** Modèle illustrant la photo-inactivation de canaux PIRK exprimés à la membrane plasmique. L'incorporation de Cmn (rouge) dans le pore du canal Kir2.1 le rend non-conducteur. L'exposition aux UVs libère de façon irréversible le groupe dimethoxynitrobenzyle, ce qui rend de nouveau le canal perméant, restaure les courants K⁺ sortants et réduit l'excitabilité de la cellule. **B.** Réaction chimique de photolyse du Cmn. La liaison S-C est clivée sous l'action de la lumière UV, ce qui libère le groupe dimethoxynitrobenzyle, pour ne laisser que la cystéine. **C.** La photo-activation de courants (à -100 mV) dans des neurones hippocampiques exprimant des canaux PIRK supprime les potentiels d'action. D'après Kang et al., 2013.

En conclusion, les UAAs photo-sensibles encodés génétiquement sont devenus des outils précieux pour la manipulation par la lumière de protéines neuronales, à la fois cytoplasmiques et membranaires. Validée en système recombinant (ovocytes, HEK), cette méthode a le potentiel pour être appliquée dans des systèmes plus natifs (des tranches de cerveau à l'animal entier), les seuls permettant d'étudier la transmission synaptique, les interactions entre les récepteurs et d'autres protéines, les cascades de signalisation intracellulaire, les réseaux neuronaux, etc. Ces UAAs photo-sensibles exprimés *in vivo* permettront ainsi de contrôler des fonctions neuronales à distance et de façon non-invasive.

2.3. Photo-pontage "état-dépendant" de récepteurs NMDA-GluN1/GluN2A

2.3.1. Contexte de l'étude

Les ions zinc (Zn^{2+}) sont abondamment présents à de nombreuses synapses excitatrices dans le cerveau. Co-stockés avec le glutamate dans les vésicules de certaines terminaisons excitatrices, le zinc est libéré dans la fente synaptique lors de l'activité synaptique; Frederickson et al., 2000 ; Sensi et al., 2009 ; Paoletti et al., 2009). Les ions Zn^{2+} agissent comme "co-transmetteurs" et participeraient à ce titre au contrôle de fonctions neuronales, notamment la plasticité synaptique (pour revue voir Sensi et al. 2009). Les récepteurs NMDA (rNMDAs) abritent plusieurs sites régulateurs fixant le zinc dans une gamme de concentrations allant du nanomolaire au micromolaire (Paoletti et al., 1997). Les ions Zn^{2+} agissent sur les rNMDAs selon deux mécanismes, l'un dépendant du potentiel et l'autre non (Mayer et al., 1987, 1989b ; Legendre & Westbrook, 1990). Ainsi, à forte concentration, les ions Zn^{2+} se comportent comme des bloqueurs du pore des rNMDAs, alors qu'à plus faible concentration (inférieure à $1 \mu M$), ce sont de puissants inhibiteurs allostériques des rNMDAs. La sensibilité des rNMDAs aux ions Zn^{2+} dépend de la sous-unité GluN2 présente : les récepteurs GluN1/GluN2A notamment possèdent un site de très haute affinité pour le zinc ($IC_{50} = 15 \text{ nM}$). Une publication récente de notre équipe (Nozaki et al., 2011) a révélé l'importance physiopathologique du site de liaison du zinc sur GluN2A grâce à l'étude d'une lignée de souris « knock-in » (KI) dont les rNMDAs sont insensibles au zinc dans la gamme submicromolaire. Ces souris sont atteintes d'une hyperalgie et d'une allodynie sévères dans des situations de douleur chronique. Le site de liaison du zinc sur GluN2A a été identifié à la fin des années 90 : il s'agit d'une poche localisée dans la crevasse interlobes du domaine N-terminal (NTD) de GluN2A (Fig 2.3.1. ; Choi & Lipton, 1999 ; Fayyazuddin et al., 2000 ; Low et al., 2000 ; Paoletti et al., 2000). Les récepteurs GluN1/GluN2B sont également sensibles au zinc ($IC_{50} \sim 1 \mu M$; Paoletti et al., 1997 ; Traynelis et al., 1998). Comme pour les récepteurs GluN1/GluN2A, cette modulation par le zinc fait intervenir le NTD de GluN2B (Rachline et al., 2005) Récemment, le NTD de la sous-unité GluN2B a été cristallisé en présence d'ions Zn^{2+} , ce qui a permis d'identifier précisément le site de haute affinité pour le

zinc sur la sous-unité GluN2B (Fig 2.3.1. ; Karakas et al., 2009). La fixation du zinc sur ce site entrainerait alors la fermeture du NTD sur son ligand, déclenchant ainsi l'inhibition du récepteur, c'est-à-dire la fermeture du canal ionique (Paoletti et al., 2000). Par ailleurs, il a été montré que la liaison du zinc sur le NTD de GluN2A faisait entrer les récepteurs GluN1/GluN2A dans un état inactif présentant une affinité plus importante pour l'agoniste (Paoletti et al., 1997; Erreger & Traynelis, 2005), ce qui constitue une propriété fondamentale des états désensibilisés (Katz & Thesleff, 1957; Hall et al., 1993), bien qu'il n'existe pas, chez les rNMDAs, de désensibilisation rapide telle qu'on l'observe chez les récepteurs AMPAs (rAMPAs).

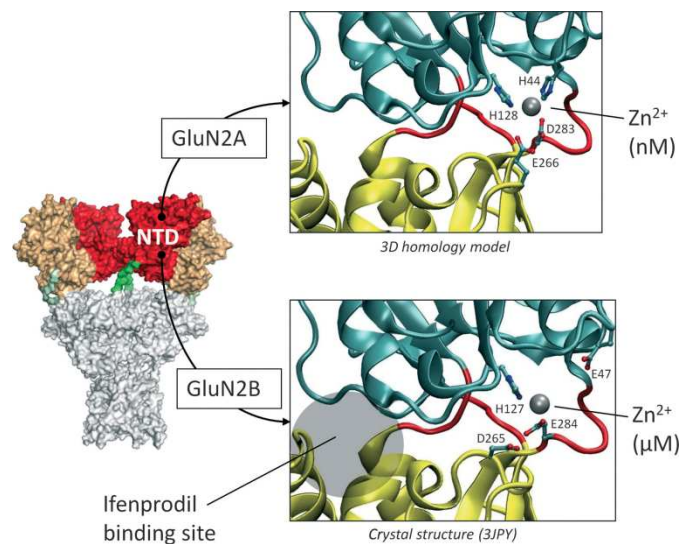


Figure 2.3.1. Les sites de liaison du zinc des récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B se trouvent dans la crevasse interlobes des NTDs de GluN2 (Gauche) Modèle d'un rNMDA entier par homologie avec la structure du rAMPA-GluA2 (Sobolevsky et al., 2009), avec les NTDs de GluN1 en orange et ceux de GluN2 en rouge. (Droite) Sites de liaison du zinc : site de haute affinité pour GluN1/GluN2A, représenté avec un modèle par homologie (haut) et site de plus faible affinité pour GluN1/GluN2B, représenté sur la structure cristallographique du dimère de NTDs GluN1/GluN2B (Karakas et al., 2009). Les résidus qui contrôlent la sensibilité au zinc sont représentés par des bâtons. D'après Paoletti, 2011.

Les mécanismes moléculaires permettant la transduction du signal, entre la fermeture du NTD suite à la liaison du zinc et la fermeture subséquente du canal dans la région transmembranaire n'ont été que partiellement élucidés. Ils mettent en jeu un couplage entre la

région la plus distale du récepteur (le NTD) où se trouve le site zinc et la machinerie de "gating" (domaine de liaison des agonistes (ABD) et domaine transmembranaire (TMD)), pourtant éloignés de plusieurs dizaines d'angströms. Connaître et comprendre les changements conformationnels à la base de ce couplage reste un défi important. Des travaux réalisés précédemment dans l'équipe et couplant notamment des expériences fonctionnelles par électrophysiologie et des pontages entre cystéines introduites par mutagenèse, ont montré que la stabilité de l'interface de dimérisation des ABDs, qui contrôle la désensibilisation des rAMPA et rKAs (Sun et al., 2002 ; Horning & Mayer, 2004 ; Armstrong et al., 2006 ; Plested & Mayer, 2009 ; Nayeem et al., 2011 ; Rambhadran et al., 2010), contrôle aussi l'inhibition par le zinc des récepteurs GluN1/GluN2A (Gielen et al, 2008). Un modèle a donc été proposé pour décrire l'inhibition de haute affinité des rNMDAs par le zinc (Fig 2.3.2). Il repose sur une caractéristique essentielle des récepteurs-canaux du glutamate : l'arrangement et le fonctionnement en dimère de dimères, des NTDs d'une part, et des ABDs d'autre part. Ainsi, lorsque le zinc se lie au NTD de GluN2A, il en induit la fermeture, ce qui provoque un écartement des lobes inférieurs des NTDs du dimère "fonctionnel" GluN1/GluN2A. Ce mouvement exerce une tension sur les lobes supérieurs des ABDs, probablement via une contrainte des "linkers" NTD-ABD, aboutissant à la rupture de l'interface d'hétéro-dimérisation des ABDs. Ces changements conformationnels provoquent à leur tour un relâchement de la tension exercée par les "linkers" ABD-TMD sur les segments transmembranaires et, par conséquent la fermeture de la porte du canal. L'inhibition par le zinc ferait donc passer les récepteurs GluN1/GluN2A dans une conformation similaire à celle des rAMPA dans l'état désensibilisé (Gielen et al., 2008).

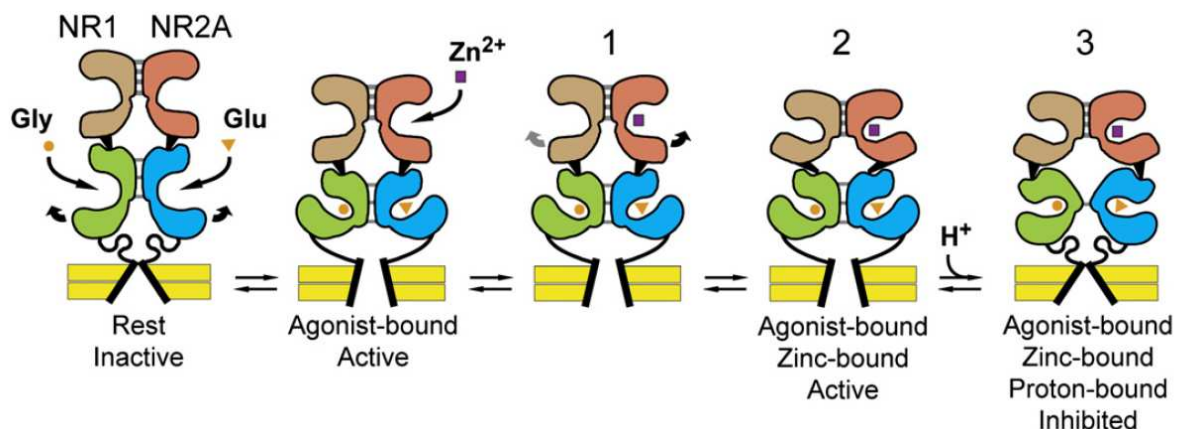


Figure 2.3.2. Modèle proposé pour l'inhibition allostérique des récepteurs GluN1/GluN2A par le zinc extracellulaire. Deux sous-unités, GluN1 et GluN2A, formant un dimère fonctionnel du rNMDA hétéromérique, sont représentées, ainsi que les changements conformationnels opérés dans le dimère entre l'état de repos, l'état activé (glutamate lié) et l'état de type "désensibilisé" (glutamate et zinc liés). *D'après Gielen et al., 2008.*

En dépit des informations structurales fournies par cette étude, la caractérisation de l'état conformationnel dans lequel se trouve un rNMDA inhibé par le zinc, est loin d'être aboutie. En effet, le modèle proposé par Gielen et al. (Fig 2.3.2) repose sur l'hypothèse forte d'une homologie structurale et fonctionnelle entre les rNMDAs et les rAMPAs. Cette homologie a conduit les auteurs à définir une interface essentielle dans les mécanismes d'inhibition des rNMDAs par le zinc. L'existence et la stabilité de cette interface, qui implique les lobes supérieurs des ABDs de GluN1 et GluN2A, n'ont cependant été étudiées que par des mesures indirectes sur des rNMDAs mutés. Quant à l'interface entre les lobes inférieurs, son existence n'a jamais été prouvée directement dans le cas des rNMDAs. En effet, dans le modèle proposé par Gielen et al. (Fig 2.3.2), le rapprochement des lobes inférieurs n'est basé que sur ce qui est connu des rAMPAs (Armstrong et al., 2006) De nouvelles données expérimentales sont donc nécessaires pour valider ou infirmer le modèle proposé.

Aucune donnée n'est donc disponible sur la formation éventuelle d'une interface entre les lobes inférieurs des ABDs de GluN1 et GluN2A suite à la liaison du zinc sur le NTD de GluN2A et, le cas échéant, sur le rôle de cette interface dans les mécanismes d'inhibition des rNMDAs par le zinc. Or cette interface a été décrite pour les rAMPAs se trouvant dans l'état désensibilisé. Plus précisément, elle a été révélée par la structure cristallographique du rAMPA-GluA2-S729C, qui piège le récepteur dans un état désensibilisé (Armstrong et al., 2006). La comparaison de cette structure avec celle du dimère "actif" non-désensibilisé GluA2-L483Y (Sun et al., 2002) a montré que, lors de la désensibilisation d'un rAMPA, l'écartement des lobes supérieurs des ABDs d'un dimère GluA2 (rupture d'une interface existante) s'accompagnait d'un rapprochement des lobes inférieurs (apparition d'une nouvelle interface) (Fig. 2.3.3.A). Cette nouvelle interface implique des résidus de l'hélice K d'un protomère et la boucle reliant les hélices F et G de l'autre (Fig. 2.3.3.B). Ces changements conformationnels, et la réorientation des sous-unités au sein du dimère qui en découle,

traduisent une déviation du dimère d'environ 12° par rapport à l'axe de symétrie, entre l'état activé et l'état désensibilisé du rAMPA.

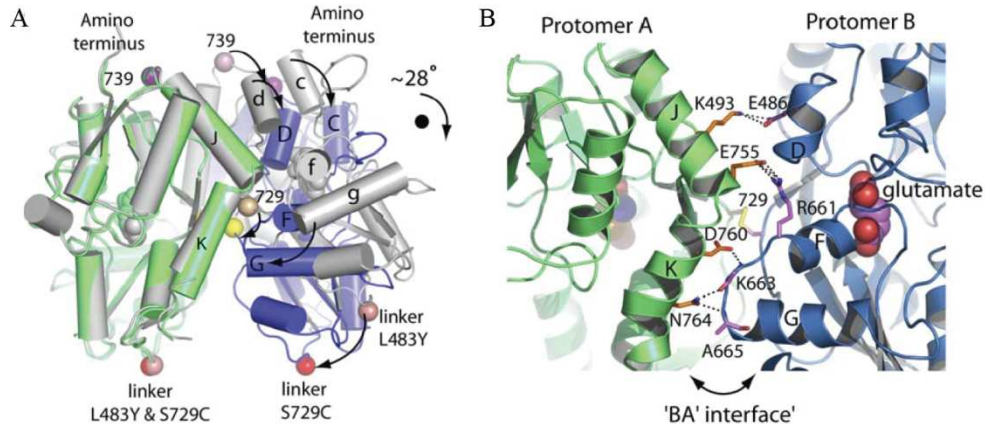


Figure 2.3.3. Réarrangements structuraux des domaines de liaison des agonistes lors de la désensibilisation des récepteurs AMPAs. **A-** Superposition des structures cristallographiques des ABDs de GluA2-L483Y (gris) et de GluA2-S729C (couleurs), observés perpendiculairement à l'axe de symétrie d'ordre 2. **B-** Interface de dimérisation des lobes inférieurs des ABDs de GluA2-S729C montrant les interactions entre l'hélice K du protomère A et la boucle reliant les hélices F et G du protomère B. *D'après Armstrong et al., 2006.*

Notre objectif est donc d'identifier et caractériser l'interface entre les lobes inférieurs des ABDs d'un rNMDA GluN1/GluN2A, et de tester l'hypothèse selon laquelle elle ne peut se former que dans certains états conformationnels du récepteur. En apportant des informations sur la dynamique conformationnelle des rNMDAs lors de l'inhibition par le zinc, cette étude nous permettra de préciser le mécanisme proposé par Gielen et al. (Gielen et al., 2008). L'idée est de piéger les récepteurs GluN1/GluN2A dans un état conformationnel particulier, en l'occurrence un état inhibé durant lequel le récepteur lie toujours les agonistes (état de type "désensibilisé"). Pour cela, nous avons choisi de tirer profit de certaines propriétés physico-chimiques d'acides-aminés non-naturels (UAAs), qui sont capables de photo-ponter des résidus voisins lorsqu'ils sont éclairés par une lumière UV. Nous avons donc incorporé un UAA sur la sous-unité GluN1 ou la sous-unité GluN2, au niveau de l'interface éventuelle entre les lobes inférieurs des ABDs, et étudié les effets de l'illumination UV sur les propriétés d'activation du rNMDA.

2.3.2. Méthodes

Biologie moléculaire

Le plasmide pSVB.Yam, contenant le gène de l'ARNt-suppresseur amber dérivé du Tyr-ARNt_{CUA} de *B.stearothermophilus*, ainsi que les constructions des enzymes ARNt-synthétases (aaRS) spécifiques de l'AzF et du Bpa et dérivées de la synthétase TyrRS de *E.coli*, ont été décrits précédemment (Ye et al., 2008 ; Ye et al., 2009). Les plasmides permettant d'exprimer les sous-unités GluN1-1a (rat) et GluN2A (rat), de même que les stratégies liées à la mutagenèse et le séquençage ont été décrits précédemment (Paoletti et al., 1997 ; Gielen et al., 2008). La numérotation utilisée pour les acides-aminés tient compte de la protéine entière y compris le peptide signal.

Co-injections des plasmides et incubation des ovocytes

Les rNMDAs recombinants sont exprimés à la surface des ovocytes de *Xénope* après co-injection, dans le noyau, des ADNc (30-50 ng/μL) codant pour les sous-unités GluN1 et GluN2 (ratio 1:1, 10 ng/μL). Les ovocytes sont préparés et injectés comme décrit précédemment (Gielen et al., 2008). Dans le cas des expériences avec UAAs, les quatre ADNc, codant pour les sous-unités GluN1 et GluN2A, l'ARNt YAM et l'enzyme aaRS, sont coinjectés dans le noyau de l'ovocyte, aux concentrations respectives, en ng/μL (sauf mention contraire dans le texte) : 40, 40, 10, 5 pour aaRS = BpaRS et 40, 40, 5, 1 pour aaRS = AzFRS. Après injection, les ovocytes sont incubés à 19°C dans une solution de Barth supplémentée avec de la gentamicine (50 ng/mL) et du D-APV (50 μM). L'AzF est dissout par sonication dans une solution de Barth (stock 10 mM) et dilué (2 mM) pour l'incubation des ovocytes. Le Bpa est dissout dans de l'eau bidistillée ddH₂O (200 mM) en ajoutant une quantité équivalente (en mole) de NaOH. Il est ensuite dilué (1mM) pour l'incubation des ovocytes (Ye et al., 2013).

Electrophysiologie

Pour les enregistrements à potentiel imposé (TEVC), la solution externe standard contient (en mM) : 100 NaCl, 0.3 BaCl₂, 5 HEPES et 2.5 KOH. Le pH est ajusté à 7.3 avec NaOH. Les courants NMDA sont induits par l'application simultanée de glutamate et de glycine à des

concentrations saturantes de 100 μM chacun. Un chélateur de métaux lourds, l'acide diéthylènetriamine-pentaacétique (DTPA ; 10 μM) est ajouté à toutes les solutions, exceptées celles contenant du zinc, afin d'éviter l'inhibition des récepteurs par le zinc contaminant (Gielen et al., 2008). Sauf mention contraire, les enregistrements sont réalisés au potentiel constant de -60 mV et à température ambiante. Les données sont recueillies et analysées par le logiciel pClamp 10 (Molecular Devices) puis traitées avec le logiciel Kaléidagraph 4.0. Les barres d'erreur représentent l'écart-type (S.D.) des valeurs moyennes des courants enregistrés.

Inhibition par le MK-801

Les cinétiques d'inhibition par le composé MK-801 sont souvent étudiées afin d'évaluer la probabilité relative d'ouverture du canal ionique (P_0) (Zhu et al., 2013). Le MK-801 (Ascent Scientific) est dissout dans l'eau bidistillée et des aliquots de 50 μM sont préparés. Ces stocks sont ensuite directement dilués, à une concentration de 10 nM, dans la solution externe standard contenant DTPA et agonistes. Les constantes de temps d'inhibition τ_{on} sont obtenues par régression mono-exponentielle des courbes de courants enregistrés durant l'application de MK-801, sur une fenêtre de temps couvrant les 10 à 90% d'inhibition maximale. Chaque τ_{on} est normalisé avec le τ_{on} moyen des récepteurs wild-type du jour.

Sensibilité aux agonistes et aux modulateurs allostériques

Les courbes doses-réponses de la glycine et du glutamate ont été réalisées comme décrit précédemment (Zhu et al., 2013). Les solutions de zinc sont préparées à partir de 100 mM de ZnCl_2 (dans 1% de HCl). La solution à 500 nM est obtenue par dissolution de cette solution stock dans la solution externe standard contenant les agonistes.

Western-Blots

La préparation des échantillons, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE), le transfert semi-sec et l'immunoblotting, ont été réalisés comme décrit précédemment (Mony et al., 2011). Les anticorps anti-GluN1 (1 :1000, souris monoclonal MAB1586 clone R1JHL ; Millipore) et anti-GluN2A (1 :500 ; rat monoclonal A12W ; Millipore) ainsi que les anticorps secondaires (de chèvre, anti-souris ou anti-rat) conjugués à la peroxydase (1 :20000, Jackson ImmunoResearch), ont été utilisés pour tous les western-blots.

Modèles par homologie

Les modèles 3D ont été réalisés à l'aide du programme Accelrys Discovery Studio 3.0 et les illustrations représentant structures cristallographiques et modèles ont été obtenues grâce au logiciel PyMol. Le modèle du dimère d'ABDs d'un récepteur NMDA GluN1/GluN2A dans une conformation de type désensibilisé a été construit à partir de la structure cristallographique d'un dimère d'ABDs d'AMPA-GluA2 (PDB 2I3V ; Armstrong et al., 2006).

2.3.3. Résultats

2.3.3.1. Modélisation par homologie d'un dimère d'ABDs GluN1/GluN2A dans une conformation "type désensibilisé"

Etant données les analogies structurales et fonctionnelles décrites entre les rAMPA désensibilisés et les rNMDAs inhibés par le zinc (Gielen et al., 2008), nous avons émis l'hypothèse selon laquelle les changements conformationnels subis par les lobes inférieurs des ABDs d'un rAMPA désensibilisé étaient retrouvés dans un rNMDA inhibé "zinc-lié". La première étape de notre travail a donc été la construction d'un modèle par homologie du dimère d'ABDs de GluN1/GluN2A (Fig. 2.3.4.B), à partir de la structure cristallographique du rAMPA-GluA2-S729C en complexe avec le glutamate (pdb 2I3V, Armstrong et al., 2006). La comparaison de ce modèle de l'état inhibé "glutamate-lié et zinc-lié", "type désensibilisé" de GluN1/GluN2A, avec la structure cristallographique du dimère d'ABDs GluN1/GluN2A dans l'état activé "glutamate-lié" (Fig. 2.3.4.A), permet d'identifier des positions critiques auxquelles il serait intéressant d'introduire un UAA photo-réactif. Ces positions correspondent à des acides-aminés susceptibles d'interagir avec des résidus de la sous-unité voisine, dans le modèle "type désensibilisé" uniquement, et qui appartiendrait donc à une nouvelle interface entre les lobes inférieurs des ABDs de GluN1 et GluN2A.

Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'hélice K de GluN1 et à la boucle reliant les hélices F et G de GluN2A, deux régions des ABDs qui viennent former une nouvelle interface dans l'état inhibé "type-désensibilisé" (Fig.2.3.4.B et C). Dans la sous-unité GluN2A, cette boucle reliant les hélices F et G est plus courte que dans GluA2, il est donc probable que certaines interactions qui caractérisent cette interface dans le rAMPA ne soient pas conservées dans les rNMDAs. En revanche, dans les rAMPA comme dans les rNMDAs, de nombreux résidus polaires se font face au niveau des lobes inférieurs des ABDs et sont donc susceptibles de stabiliser l'interface entre lobes inférieurs des ABDs par des liaisons

hydrogènes et/ou électrostatiques. Nous avons finalement choisi de muter deux résidus sur GluN1 (E786, K790) et cinq résidus sur GluN2A (N696, N697, Y698, P699 et Y700).

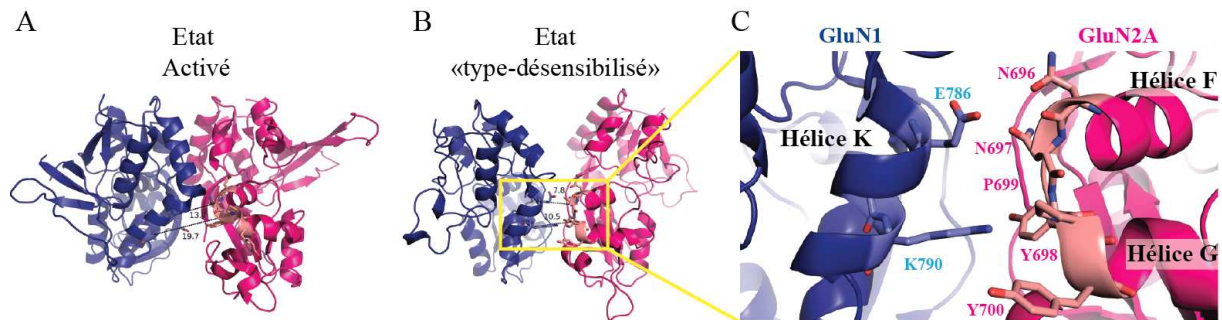


Figure 2.3.4. Le modèle par homologie d'un hétérodimère d'ABDs dans un état "type désensibilisé" met en évidence une nouvelle interface entre les lobes inférieurs des ABDs de GluN1 et GluN2A. **A-** Dimère d'ABDs GluN1 (bleue)/GluN2A (rose) représenté dans l'état activé du récepteur (structure cristallographique, pdb 2A5T). **B-** Modèle du dimère d'ABDs d'un rNMDA GluN1/GluN2A dans l'état "type désensibilisé" réalisé à partir de la structure cristallographique du dimère d'ABDs de GluA2-S729C piégé dans un état désensibilisé (PDB : 2I3V; Armstrong et al, 2006). **C-** Interface entre les lobes inférieurs de GluN1 et GluN2A telle qu'elle est définie dans le modèle. Les résidus présents à l'interface sont représentés par des sticks, roses pâles pour les résidus de GluN2A et violets pour ceux de GluN1.

2.3.3.2. Incorporation d'acides-aminés non-naturels photo-réactifs dans la région identifiée comme interface potentielle entre lobes inférieurs des ABDs.

Les résidus que nous avons choisi de muter, de part leur position à l'interface entre les lobes inférieurs des ABDs GluN1 et GluN2A dans notre modèle, sont de bons candidats pour un photo-pontage inter-sous-unités. Suivant l'approche développée dans notre précédent travail d'expansion du code génétique dans les ovocytes de *Xenopus laevis* (Fig. 2.3.5 et voir Résultats 2.1 ; Ye et al, 2013), nous avons introduit, par mutagenèse dirigée, le codon stop ambre (TAG) à l'une des positions choisies de GluN1 ou GluN2A, à la place du triplet codant. Nous avons ensuite co-injecté les ADNc codant pour l'ARNt suppresseur (YAM) et l'aminocyl-ARNt synthétase (RS) (paires Yam/AzF-RS ou Yam/Bpa-RS) ainsi que les sous-

unités GluN1 de type sauvage (GluN1wt) et GluN2A mutante (ou l'inverse). Les ovocytes sont ensuite incubés en présence de l'UAA (AzF ou Bpa) pendant vingt-quatre heures ou plus. Un à deux jours après l'injection, les courants engendrés par ces récepteurs sont mesurés en utilisant la technique du TEVC (mesure de courant en potentiel imposé à deux électrodes). Des courants ont pu être enregistrés pour tous les mutants testés hormis les récepteurs GluN1-K790AzF/GluN2Awt et GluN1-K790Bpa/GluN2Awt qui sont non fonctionnels.

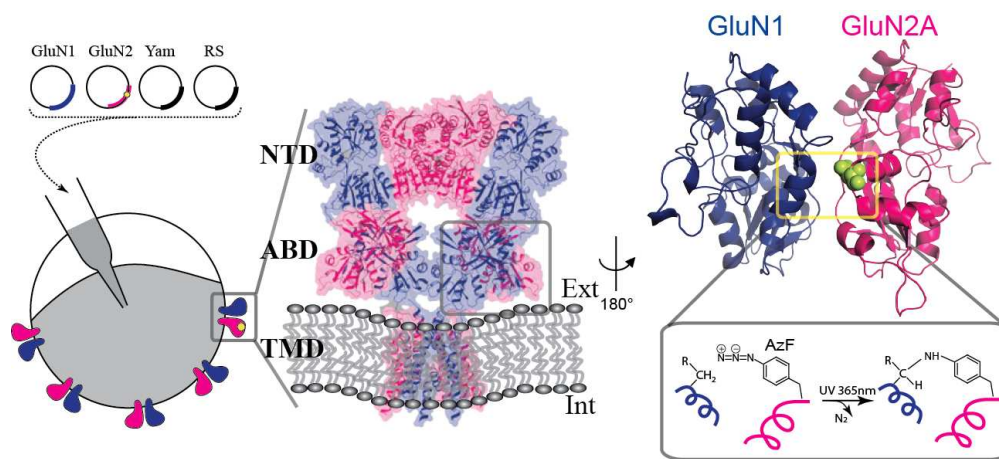


Figure 2.3.5. Incorporation d'un acide-aminé non-naturel, photo-activable et encodé génétiquement, dans un récepteur NMDA GluN1/GluN2A, au niveau des lobes inférieurs des ABDs. *Gauche* : Représentation schématique de l'injection du matériel génétique dans un ovocyte de *Xénope* : les quatre plasmides encodant, ici, la sous-unité GluN1wt, le mutant GluN2A-amb, l'ARNt suppresseur (Yam), et l'enzyme aminoacyl-ARNt synthétase (RS) sont co-injectés dans le noyau des ovocytes. *Milieu* : Un rNMDA modélisé à partir de la structure cristallographique de GluA2 (PDB 3KG2, Sobolevsky et al., 2009) vu perpendiculairement à l'axe de symétrie d'ordre 2. *Droite* : Modèle d'un hétérodimère d'ABDs GluN1/GluN2A d'un rNMDA dans l'état "type-désensibilisé". Une des positions à laquelle l'AzF a été incorporé est représentée par une sphère jaune. Sous l'effet de l'irradiation, la fonction azide de l'AzF génère un bi-radical qui peut réagir de façon covalente avec un résidu voisin.

Nous avons alors soumis les ovocytes à une exposition aux UVs (365 nm ; durée de trois minutes). Notre objectif étant de figer les récepteurs GluN1/GluN2A dans un état conformationnel particulier, nous avons appliqué l'UV en présence des agonistes seuls ou avec du zinc (à 500 nM d'ions Zn^{2+} libres). Cela nous a permis d'évaluer les effets de l'UV

dans deux états du récepteur : état actif ou état inhibé par le zinc. Concernant les mutants AzF (Fig. 2.3.6.A), on observe une inhibition significative des courants pour les récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF, Y698AzF et Y700AzF lorsque l'UV est appliqué en présence d'agonistes et de zinc. Cependant, seuls les récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF ($I_{UV}/I_0=0.94\pm 0.1$ (-Zn) vs $I_{UV}/I_0=0.57\pm 0.07$ (+Zn), $p<0.001$) et GluN1wt/N2AY700AzF ($I_{UV}/I_0=1\pm 0.13$ (-Zn) vs $I_{UV}/I_0=0.79\pm 0.03$ (+Zn) ; $p<0.01$) sont spécifiquement photo-inhibés dans l'état "zinc-lié". Les effets de l'exposition UV sur les mutants ayant incorporé le Bpa sont plus contrastés. Si on observe, pour la plupart des mutants, une inhibition des courants induite par l'UV en présence de zinc uniquement, celle-ci est faible puisqu'elle est comprise entre 11% pour GluN2A-N696Bpa et 25 % pour GluN2A-N697Bpa (Fig. 2.3.6.B).

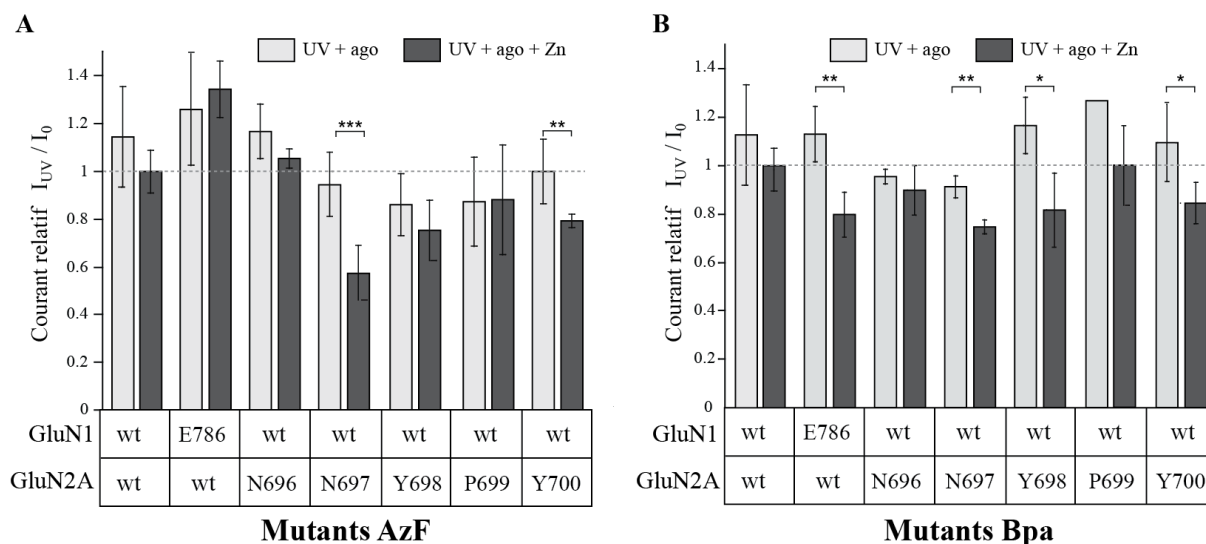


Figure 2.3.6. Effets de l'application d'UVs sur l'amplitude des courants portés par les récepteurs mutants, ayant incorporé un AzF ou un Bpa sur l'une de leurs sous-unités. Diagrammes représentant le rapport des amplitudes de courant mesurés après (I_{UV}) et avant (I_0) traitement UV pour les récepteurs ayant incorporé un AzF (A) ou un Bpa (B) dans l'une de leurs sous-unités. L'UV est appliqué en absence (gris clair) ou présence (gris foncé) de zinc. Test de Student : * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Bien que les effets de l'application d'UVs sur la plupart des récepteurs soient limités, la tendance que l'on observe, que ce soit pour les récepteurs ayant incorporé l'AzF ou le Bpa, est celle d'une photo-inactivation partielle des rNMDAs mutés lorsque ceux-ci se trouvent dans un état inhibé "zinc-lié". Parmi les six mutants testés, un seul se démarque : il s'agit du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697amb, avec en particulier une photo-inhibition significative et spécifique de GluN1wt/GluN2A-N697AzF en présence de zinc. Nous avons donc choisi d'étudier plus en détail ce récepteur et caractériser la photo-inactivation observée.

2.3.3.3. Caractérisation de la photo-inactivation du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF.

En présence de zinc, l'inhibition des courants portés par les récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF (notés "récepteurs N2A-N697AzF" dans la suite ; Fig. 2.3.7.A) induite par l'application de l'UV est de l'ordre de 50%. Le fait que la photo-inactivation ne soit que partielle peut être dû à : (1) de la 'fuite' lors de la traduction de la protéine, avec l'incorporation d'une tyrosine endogène, au lieu de l'AzF, à la lecture du codon-stop ambre, (2) un effet partiel de l'UV sur l'AzF ou (3) 100% de récepteurs modifiés mais piégés dans un état d'activité plus faible (mais non nulle).

L'incorporation de l'UAA à la position GluN2A-N697 est efficace

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons mené une série d'expériences électrophysiologiques. Tout d'abord, après avoir injecté l'ensemble des ADNc dans des ovocytes de *Xénope*, nous avons comparé le niveau d'expression de ces ovocytes selon leur milieu d'incubation. Lorsque les ovocytes étaient incubés avec l'AzF (2 mM), des courants de plusieurs centaines de nA à plusieurs μ A étaient détectés, un à deux jours après l'injection, le taux d'expression avoisinant les 95% (Fig. 2.3.7.B). A contrario, la grande majorité des ovocytes conservés dans un milieu dépourvu d'AzF ne génère pas ou peu de courant (inférieurs à 30 nA ; présence de quelques "outliers" toutefois) (Fig. 2.3.7.B).

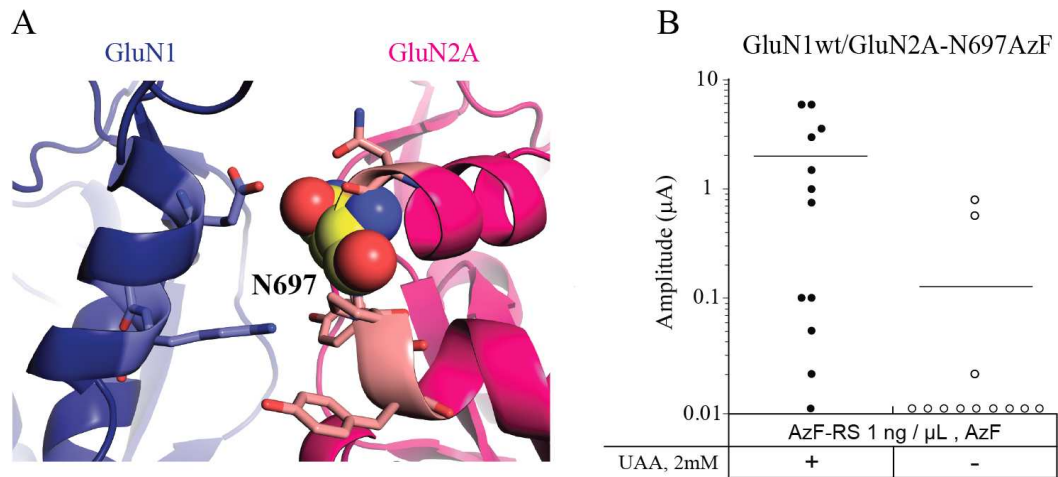


Figure 2.3.7. Les récepteurs ayant incorporé l'AzF sont correctement exprimés à la surface des ovocytes. **A-** Interface entre l'hélice K de GluN1 (bleue) et la boucle de GluN2A (rose) comprises entre les hélice F et G, dans le modèle du dimère d'ABDs d'un rNMDA "type désensibilisé". Le résidu GluN2A-N697 est représenté par des sphères. **B-** Graphique représentant point par point les amplitudes des courants traversant les récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697amb, incubés en présence (gauche) ou en absence (droite) d'AzF dans le milieu. Pour chacune des conditions 12 ovocytes ont été testés. Les courants inférieurs à 0.01 μ A ont été arbitrairement placés à 0.01 μ A.

Cela démontre l'efficacité du tandem YAM/AzF-RS pour reconnaître le codon stop et permettre l'incorporation d'AzF dans la chaîne protéique en cours de synthèse. Ainsi, les récepteurs ayant incorporé un UAA (ici l'AzF) en position GluN2A-N697 sont correctement exprimés à la surface des ovocytes et restent fonctionnels. Inversement, les récepteurs n'ayant pas incorporé l'AzF ne participent pas (ou très peu) aux courants mesurés et ne sont donc pas à l'origine des 50% de courant restant après illumination.

L'inhibition de GluN1wt/GluN2A-N697AzF est due à la photo-réactivité de l'AzF.

Afin de s'assurer que l'AzF était bien responsable de l'inhibition des courants portés par les récepteurs N2A-N697AzF, après application d'UVs, nous avons comparé cette inhibition avec les effets observés dans le cas de rNMDAs de type sauvage (Fig. 2.3.8-A et B). Rappelons que, après application d'UVs en présence d'agonistes et de zinc, l'amplitude des courants mesurés est significativement réduite, puisqu'elle se représente plus que 57 % de l'amplitude initiale. Les récepteurs de type sauvage, quant à eux, ne sont pas affectés par l'exposition aux UVs ($I_{UV}/I_0 = 1.01 \pm 0.07$, $n=4$). Ce résultat confirme le rôle de l'AzF dans la photo-inactivation des récepteurs N2A-N697AzF et prouve également que le traitement UV n'endommage pas les ovocytes ni n'affecte les fonctions de base du récepteur. Enfin, nous avons montré que la photo-inactivation de N2A-N697AzF, en présence de zinc, était irréversible ($I_5/I_{UV} = 1.008 \pm 0.01$ avec I_5 intensité du courant 5' après fin de l'exposition UV) (Fig. 2.3.8.C), comme cela est attendu si l'inhibition passe par la formation d'une liaison covalente c'est-à-dire par le photo-pontage de l'AzF avec un résidu voisin.

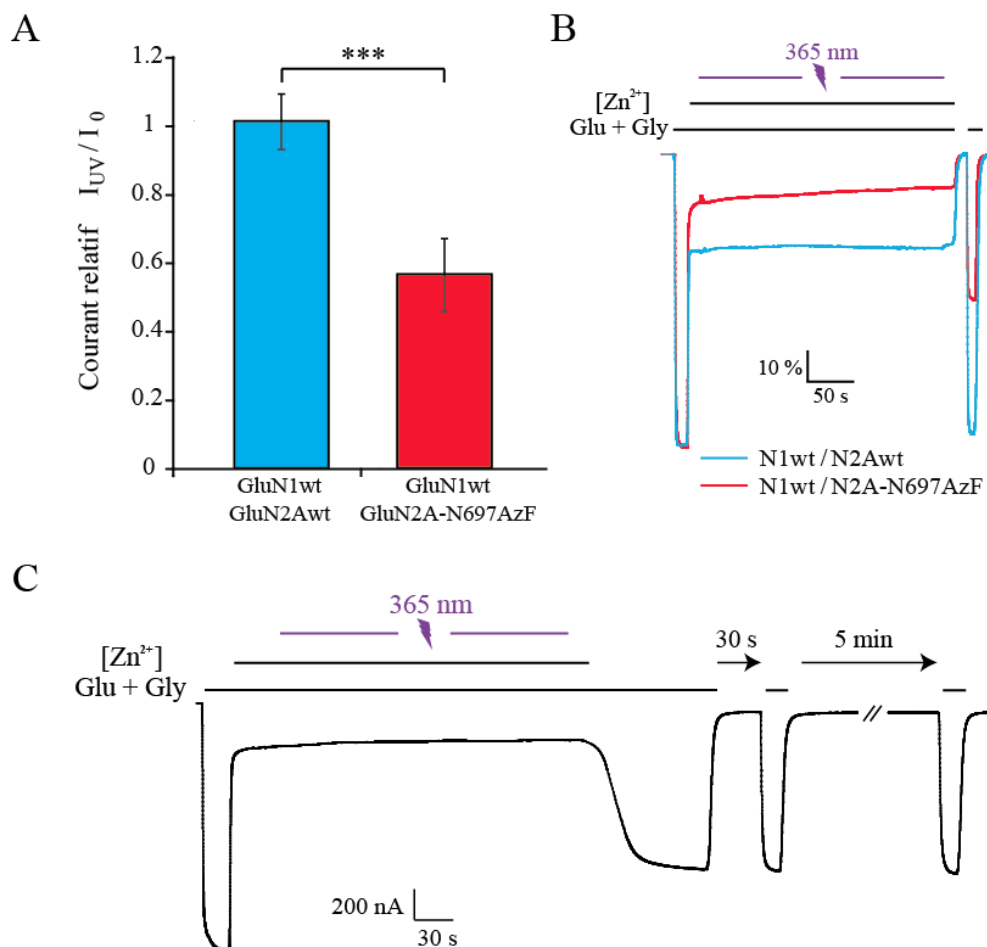


Figure 2.3.8. La photo-inhibition est spécifique du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF. **A-** Diagramme représentant le rapport des amplitudes de courant mesurées après (I_{UV}) et avant (I_0) traitement UV pour les rNMDAs de type sauvage (bleu) et les récepteurs N2A-N697AzF (rouge). test de Student : *** : $p < 0.001$. **B-** Traces représentant les courants mesurés en présence d'agonistes (glutamate et glycine, 100 μ M) et de zinc (0.5 μ M) et montrant l'effet de l'application d'UV sur les rNMDAs de type sauvage (bleu) et les récepteurs N2A-N697AzF (rouge). **C-** Trace représentant l'amplitude du courant traversant les récepteurs N2A-N697AzF avant et après exposition aux UVs, à divers intervalles de temps : 0", 30" et 5'.

La photo-inactivation du récepteur est dépendante de l'état conformationnel du récepteur

Nous avons montré précédemment que (1) les courants mesurés proviennent (quasi) exclusivement de récepteurs ayant incorporé d'AzF à la position GluN2A-N697 ; (2) le récepteur N2A-N697AzF est partiellement photo-inactivé lorsque l'UV est appliqué en présence de zinc ; (3) cet effet est directement lié à la présence de l'AzF ; (4) la photo-inactivation en présence de zinc est irréversible, argument en faveur d'un photo-pontage (covalent) entre l'AzF et un résidu à proximité. Afin de confirmer que la photo-inactivation de N2A-N697AzF ne pouvait avoir lieu que dans un état conformationnel donné du récepteur, nous avons réitéré l'expérience du 2.3.3.2 avec un grand nombre d'ovocytes. Ainsi, lorsque l'UV est appliqué en présence des seuls agonistes (sans zinc), seulement deux des dix-huit ovocytes testés sont inhibés de plus de 15%. Les récepteurs N2A-N697AzF ne sont donc pas affectés par le traitement UV lorsqu'ils se trouvent dans un état actif ("agonistes-liés"). A contrario, lorsque l'UV est appliqué en présence de zinc, l'inhibition des courants est systématique et est comprise entre 30 et 60% (Fig. 2.3.9).

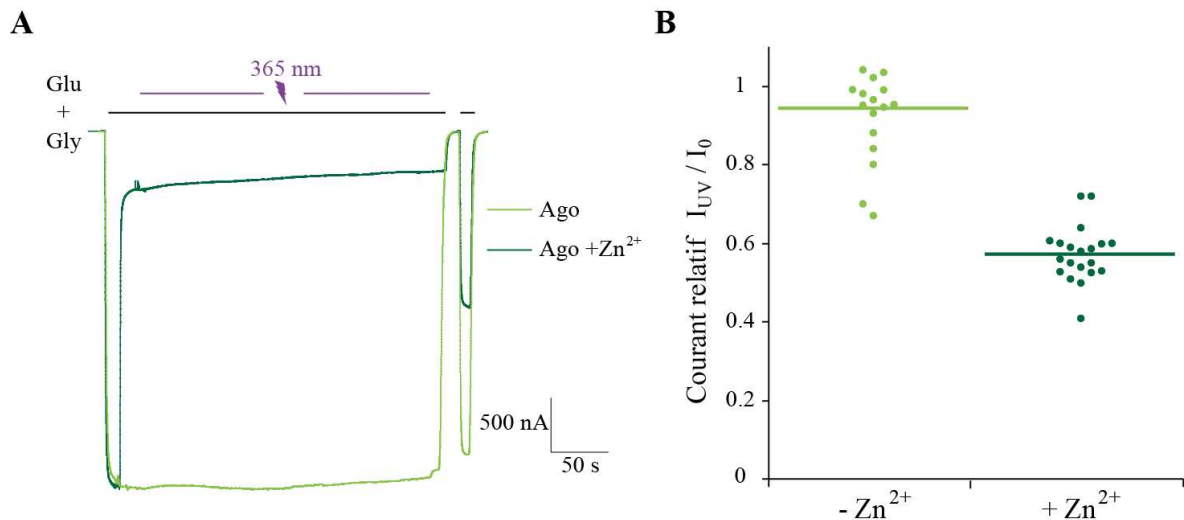


Figure 2.3.9. La photo-inhibition du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF n'a lieu qu'en présence de zinc. **A**- Traces représentant les courants portés par les récepteurs N2A-N697AzF, pendant une exposition de 5' à la lumière UV, en présence d'agonistes (vert clair) ou d'agonistes et de zinc (vert foncé). **B** - Graphique représentant point par point les courants relatifs I_{UV}/I_0 , I_{UV} étant mesuré après 5' d'exposition aux UVs pour les récepteurs N2A-N697AzF. L'UV est appliqué en absence (vert clair) ou en présence de zinc (vert foncé).

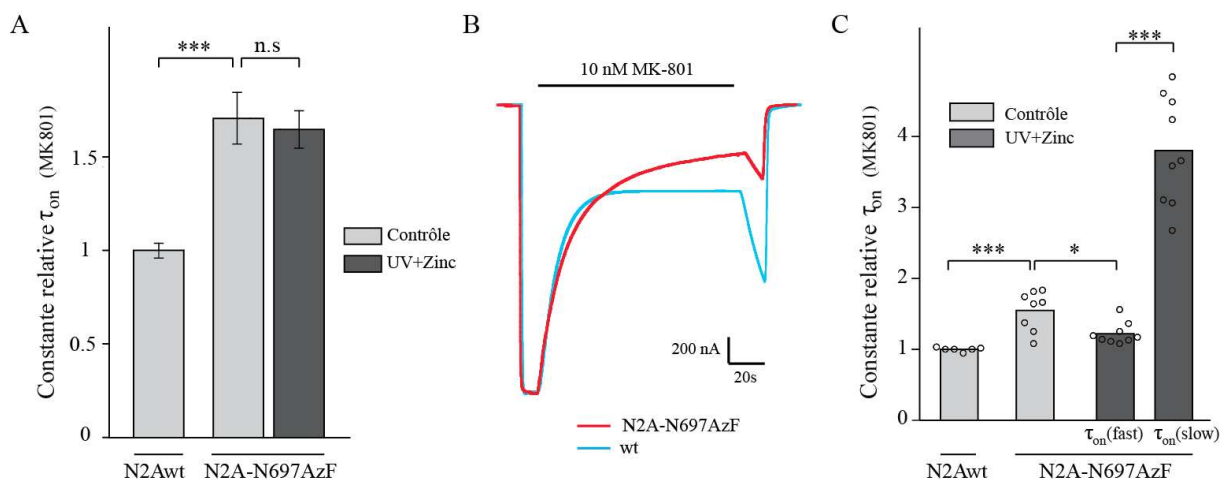
Ces différents résultats confirment la photo-inactivation des récepteurs N2A-N697AzF et montrent qu'elle est liée au pontage entre l'AzF (à la position N697) et un résidu proche, et ce, seulement lorsque le récepteur est dans un état inhibé "zinc-lié".

2.3.3.4. Propriétés fonctionnelles du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivé.

Après avoir décrit la photo-inactivation des récepteurs N2A-N697AzF et sa spécificité, nous avons entrepris de caractériser ce récepteur photo-inactivé d'un point de vue fonctionnel.

Probabilité d'ouverture des récepteurs photo-inactivés

Dans un premier temps, nous avons estimé la probabilité maximale d'ouverture du canal ionique des récepteurs N2A-N697AzF photo-inactivés en mesurant les cinétiques d'inhibition par le MK-801, un bloqueur du pore des rNMDAs (Fig. 2.3.10. A et B). Ce composé ne se fixant sur le récepteur que lorsque le canal ionique est ouvert, la vitesse à laquelle il inhibe les courants est directement liée à la probabilité d'ouverture du canal. Cette approche est classiquement utilisée pour estimer la probabilité d'ouverture des canaux des rNMDAs (voir Gielen et al., 2009). L'incorporation de l'AzF à la position N697 se traduit, avant tout traitement à la lumière UV, par une baisse de la probabilité d'ouverture du récepteur ($\tau_{on} = 1.71 \pm 0.13$, avec $\tau_{on} = \tau_{AzF} / \tau_{wt}$, constante de temps relative d'inhibition ; Fig. 2.3.10.A). L'encombrement important de l'AzF par rapport au résidu endogène, une asparagine, pourrait expliquer cette modification initiale de la probabilité d'ouverture. De façon surprenante, l'exposition aux UVs, en présence de zinc, des récepteurs mutants N2A-N697AzF, n'altère pas les cinétiques d'inhibition par le MK801 ($\tau_{on} = 1.65 \pm 0.1$; Fig. 2.3.10.A et B).



Une explication plausible à cette absence d'effets visibles du traitement UV sur la probabilité des récepteurs serait que les récepteurs inactivés soient rendus totalement silencieux. Ils ne participeraient pas au courant total enregistré et ne seraient donc pas inhibés par le bloqueur du pore MK801. Ainsi, les cinétiques d'inhibition observées seraient celles des récepteurs mutants non modifiés par le traitement UV, et donc identiques aux valeurs mesurées pour les récepteurs dans la condition contrôle (sans exposition aux UVs). Dans cette hypothèse, la photo-inhibition seulement partielle des récepteurs serait due au fait que l'application d'UVs n'affecte le fonctionnement normal que d'une fraction (environ 50 %) des récepteurs N2A-N697AzF.

Cependant, une observation a attiré notre attention. En effet, le "fit" des courbes d'inhibition par le MK801, avec une seule exponentielle, est mauvais, dans le cas des récepteurs N2A-N697AzF ayant été exposés aux UVs (Fig **2.3.10.B**). Ce phénomène peut être dû à l'existence d'une double population à la membrane plasmique. Nous avons donc procédé à une deuxième analyse des courbes avec cette fois-ci un "fit" à deux exponentielles (Fig. **2.3.10.C**). Comme attendu, la régression est bien meilleure et plus pertinente. Elle met en évidence deux constantes de temps d'inhibition distinctes et bien réparties (chacune d'entre elle caractérise environ 50 % de la portion de courbe "fittée"). La constante de temps relative dite "lente" ($\tau_{on}=3.8 \pm 0.76$) est trois fois plus grande que la constante dite "rapide" ($\tau_{on}=1.22 \pm 0.15$), dont la valeur est comprise entre celle des récepteurs de type sauvage et celle des récepteurs N2A-N697AzF avant traitement UV. Cette constante "rapide" correspond probablement à des récepteurs N2A-N697AzF non affectés par l'application d'UVs. La constante "lente", quant à elle, caractérise une population dont la probabilité maximale d'ouverture du canal est significativement réduite (mais pas abolie). Cette discrimination entre deux populations suggère que, après exposition aux UVs, la moitié des récepteurs N2A-N697AzF ont subi un photo-pontage et que la probabilité maximale d'ouverture de ces récepteurs photo-pontés est significativement réduite.

Affinité des récepteurs photo-inactivés pour les agonistes

L'affinité pour les agonistes est une autre propriété importante que nous avons souhaité déterminer dans le cas des récepteurs N2A-N697AzF photo-inactivés. Dans ce but, nous avons réalisé, après une exposition de trois minutes aux UVs, un dosage du glutamate et de la glycine permettant d'activer les récepteurs N2A-N697AzF.

L'affinité pour la glycine, co-agoniste des rNMDAs se fixant sur la sous-unité GluN1, n'est pas affectée par l'incorporation de l'AzF dans la séquence protéique de GluN2A (avant traitement UV, pour N2A-N697AzF et N2Awt respectivement : $EC_{50}=2.15 \mu\text{M}$, $n_H=1.17$ et $EC_{50}=2.16 \mu\text{M}$, $n_H=2.3$; Fig. 2.3.11.A). De même, l'application d'UVs sur les ovocytes, en présence de zinc, ne modifie pas l'affinité pour la glycine des récepteurs GluN2A-N697AzF photo-inactivés ($EC_{50}=2.23 \mu\text{M}$, $n_H=1.57$; Fig. 2.3.11.A). A conditions saturantes en glutamate, le co-agoniste glycine active donc de la même façon les rNMDAs de type sauvage et les récepteurs N2A-N697AZF photo-pontés (en supposant que ces derniers soient toujours actifs et participent au courant total mesuré après exposition aux UVs).

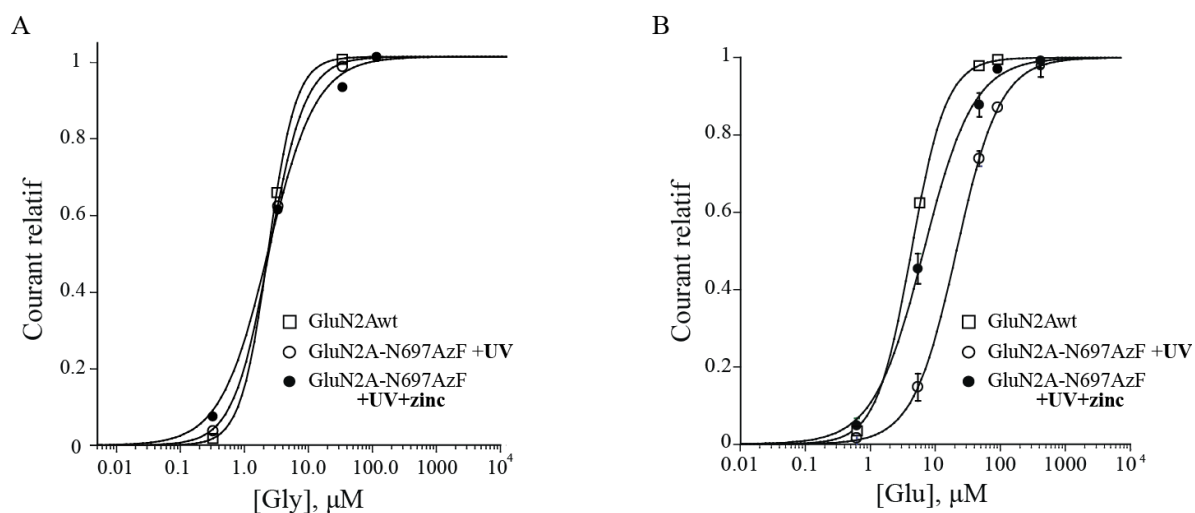


Figure 2.3.11. La photo-inactivation des récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF augmente leur affinité pour le glutamate. Doses- réponses (A) à la glycine, en présence de 100 μM de glutamate, et (B) au glutamate en présence de 100 μM de glycine ; pour N1wt/N2Awt (carrés) et N1wt/N2A-N697AzF avant traitement UV (cercles vides) et après traitement UV (cercles pleins)

Concernant l'affinité des récepteurs N2A-N697AzF pour le glutamate, avant traitement UV, on observe un déplacement de l' EC_{50} du glutamate vers des valeurs plus élevées que celles d'un rNMDA de type sauvage (avant traitement UV, pour N2A-N697AzF et N2Awt respectivement : $EC_{50}=21.2 \mu\text{M}$, $n_H=1.22$ *et* $EC_{50} = 3.87 \mu\text{M}$; $n_H=1.53$; Fig. **2.3.11.B**). La présence de l'AzF à la position N697 sur GluN2A diminue donc l'affinité du rNMDA pour la glutamate, ce qui confirme la "gêne" créée par l'AzF comme déjà suggérée par l'observation de la baisse de la probabilité d'ouverture associée à l'introduction de l'UAA (ref à la figure 2.3.10C). Par ailleurs, après application d'UVs, en présence de zinc, les récepteurs N2A-N697AzF sont beaucoup plus sensibles au glutamate qu'avant traitement. En effet, la valeur de l' EC_{50} pour les récepteurs exposés aux UVs est proche de celle d'un rNMDA de type sauvage ($EC_{50}=6.17$, $n_H=1.06$; Fig. **2.3.11.B**).

L'ensemble de ces résultats (cinétiques MK801 et sensibilité aux agonistes) confirme qu'une partie significative (~50 %) des récepteurs N2A-N697AzF est photo-pontée et que ce pontage affecte les propriétés biophysiques des récepteurs. Ainsi, nous avons mis en évidence que, après photo-pontage en présence de zinc : (1) la probabilité d'ouverture du canal ionique des rNMDAs GluN1wt/GluN2A-N697AzF était réduite et (2) leur affinité pour l'agoniste glutamate était augmentée. Ces deux propriétés sont caractéristiques des états désensibilisés. Nous sommes donc parvenus par photo-pontage à piéger un rNMDA dans un état inhibé "zinc-lié" de type désensibilisé.

2.3.3.5. Pontage inter-sous-unités du récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF photo-inactivé.

Dès lors que nous avons obtenu les preuves d'un photo-pontage impliquant l'AzF incorporé au niveau du lobe inférieur de la sous-unité GluN2A, nous avons voulu savoir quelle autre région du récepteur était impliquée dans ce photo-pontage. En effet, le nitrène, obtenu après excitation du groupe azide de l'AzF, peut interagir de façon covalente, soit avec un résidu de

Figure 2.3.12. Formation d'hétérodimères GluN1-GluN2A après traitement UV (en présence de zinc) des récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF. A- Immunoblots d'ovocytes de *Xénope* exprimant soit le récepteur de type sauvage, soit les mutants GluN2A-N697AzF ou GluN2A-N697Bpa. Les mutants sont préalablement exposés ou non aux UVs, en présence ou en absence de zinc. Les bandes correspondant aux monomères GluN1 (M1, ~130 kDa) et GluN2A (M2, ~180 kDa) et à l'hétérodimère (D1/2, ~310 kDa) sont indiquées par des flèches noires. Les bandes d'hétérodimères sont également désignées directement par des flèches bleues.

En conclusion, nous avons réussi à piéger un rNMDA dans un état inhibé "zinc-lié" de type désensibilisé en mobilisant les lobes inférieurs de GluN1 et GluN2A par photo-pontage. D'après notre modèle, en effet, c'est avec un résidu du lobe inférieur de GluN1 que l'AzF a la plus grande probabilité d'interagir (Fig. 2.3.13.A). Pour améliorer la prédiction, nous avons substitué, dans notre modèle, l'asparagine N697 par une tyrosine, l'acide aminé naturel le plus proche en structure de l'AzF. D'après les distances mesurées, entre l'oxygène de la chaîne latérale de la tyrosine et le carbone γ des résidus de l'hélice K de GluN1 (voir Sato et al., 2011 pour le choix du C_γ), les résidus de GluN1 les plus susceptibles d'interagir avec l'AzF à la position N697 sont E786 ($d_{C_\gamma-O}=6.3 \text{ \AA}$) et K790 ($d_{C_\gamma-O}=4.5 \text{ \AA}$). Nous avons tenté de savoir si l'un des deux était le partenaire d'interaction de l'AzF par une approche de mutagenèse classique couplée à de l'électrophysiologie. Notre hypothèse est que raccourcir la chaîne latérale du partenaire (par exemple en le remplaçant par une alanine) l'empêchera d'interagir avec l'AzF. En éliminant ce photo-pontage, nous espérons supprimer l'inhibition observée après l'application d'UVs sur les ovocytes.

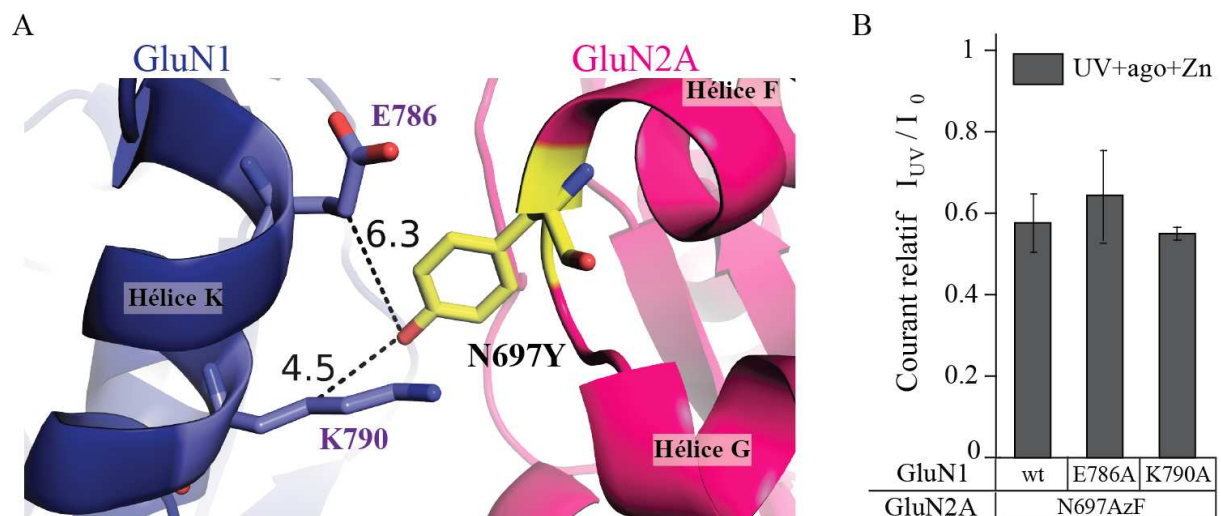


Figure 2.3.13. Résidus de GluN1 susceptibles d'être photo-pontés par l'AzF introduit en position GluN2A-697 . **A-** l'hélice K du lobe inférieur de l'ABD Interface entre l'hélice K du lobe inférieur de GluN1 (bleue) et la boucle de GluN2A (rose) comprises entre les hélice F et G, dans le modèle du dimère d'ABDs d'un rNMDA "type désensibilisé". Le résidu GluN2A-N697 a été substitué par une tyrosine (jaune) qui est représentée par des sphères. Les distances mesurées entre l'oxygène de la tyrosine et les C γ des résidus de GluN1 voisins (violet) sont indiquées (pointillés). **B-**Diagramme représentant le rapport des amplitudes de courant mesurés avant (I_0) et après et traitement UV en présence de zinc (I_{UV}) pour les rNMDAs GluN1wt/GluN2A-N697AzF, GluN1-E786A/GluN2A-N697AzF et GluN1-K790A/GluN2A-N697AzF.

Nous avons donc comparé l'effet d'une exposition de trois minutes aux UVs, en présence de zinc, sur l'amplitude des courants portés par les récepteurs (Fig. **2.3.13.B**). D'après nos observations, les récepteurs porteurs de cette mutation alanine sur GluN1, à l'une ou l'autre des positions, E786 ou D790, sont toujours photo-inhibés (les valeurs respectives de I_{UV}/I_0 sont : 0.57 ± 0.07 ; 0.64 ± 0.1 et 0.55 ± 0.02). A ce stade, nous ne pouvons pas conclure sur le rôle des résidus GluN1-E786 et GluN1-K790 dans le photo-pontage avec l'AzF697, tout du moins, cette méthode ne nous aura pas permis, pour l'instant, de déterminer le partenaire d'interaction de l'UAA introduit en position 697 sur la sous-unité GluN2A.

2.3.3.6. Le récepteur GluN1wt/GluN2A-N697AzF est aussi photo-inactivé dans des conditions de pH acide.

En dernier lieu, nous avons voulu confirmer l'importance de l'état conformationnel du récepteur N2A-N697AzF dans le photo-pontage entre les sous-unités GluN1 et GluN2A. Des travaux antérieurs ont montré qu'il existait une corrélation entre la modulation allostérique négative par le zinc et l'action inhibitrice des protons (voir Fig. **2.15** de l'Introduction **2.2.5.3** ; Choi & Lipton, 1999 ; Low et al., 2000 ; Gielen et al., 2008). Nous avons donc exposé les ovocytes aux UVs, en absence d'agonistes et de zinc, mais à un pH plus acide que le pH physiologique (pH = 6.3 vs pH = 7.3 dans les conditions normales). Le traitement UV effectué dans ces conditions entraîne des effets variables sur les courants portés par les

récepteurs N2A-N697AzF (Fig. 2.3.14). On observe notamment une inhibition des courants après UV même lorsque celui-ci est appliqué à pH 7.3, et sans agoniste ni zinc ($I_{UV}/I_0 \sim 0.71 \pm 0.09$). Il n'est pas impossible que certains récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF puissent être photo-pontés dans l'état de repos. Malgré tout, on observe une photo-inhibition plus marquée, ($I_{UV}/I_0 \sim 0.49 \pm 0.15$) lorsque l'UV est appliqué à pH acide (pH = 6.3) et similaire à celle observée à pH physiologique mais en présence de zinc. Ce résultat apporte un argument supplémentaire en faveur d'une photo-inactivation spécifique de l'état conformationnel, ici de type "proton-lié désensibilisé", dans lequel se trouve le récepteur.

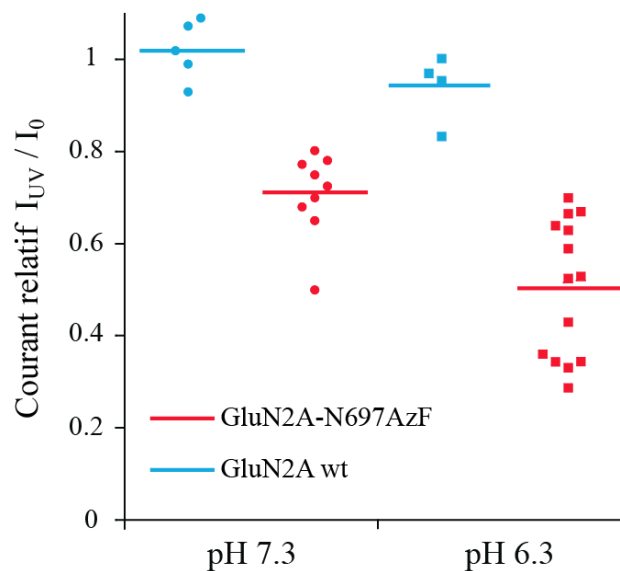


Figure 2.3.14. L'application d'UVs dans des conditions de pH acide photo-inactive les récepteurs GluN1wt/GluN2A-N697AzF. Graphique représentant point par point les courants relatifs I_{UV}/I_0 , I_{UV} étant mesuré après 5' d'exposition aux UVs. L'UV est appliqué soit à pH 7.3 (gauche) soit à pH 6.3 (droite) sur les récepteurs de type sauvage (bleu) ou mutant (rouge).

2.3.4. Discussion

2.3.4.1. Conclusions de l'étude

En combinant mutagenèse dirigée par expansion du code génétique, électrophysiologie et biochimie, nous avons confirmé que les ABDs de GluN1 et GluN2A subissaient, lors de l'inhibition des rNMDAs par le zinc extracellulaire, des changements conformationnels substantiels. Nous montrons également que la photo-réactivité conférée par l'UAA AzF permet de piéger une conformation particulière du récepteur impliquant une interface hétérodimérique, très probablement entre les lobes inférieurs de l'ABD de GluN1 et celui de GluN2A. Notre étude a confirmé le potentiel de l'approche par expansion du code génétique, qui permet d'incorporer à n'importe quel site du rNMDA, un UAA capable de photo-pontage. La formation de cette liaison covalente permet à la fois de piéger des états conformationnels particuliers et également de définir et d'étudier de nouvelles interfaces.

La mise en œuvre efficace de l'expansion du code génétique et l'utilisation d'un UAA photo-réactif a permis de photo-inactiver partiellement un rNMDA. Cette photo-inhibition dépend de l'état conformationnel dans lequel se trouve le récepteur lorsqu'on expose les ovocytes à un rayonnement UV prolongé. On ne l'observe en effet qu'en présence de zinc, un modulateur allostérique négatif des rNMDAs, dont les récepteurs GluN1/GluN2A possèdent un site de très haute affinité, et qui font entrer ces récepteurs dans un état semblable (d'un point de vue structurale) à celui des rAMPA et rKAs lors de la désensibilisation rapide (Gielen et al., 2008). Cette photo-inactivation est irréversible ce qui confirme le caractère covalent de l'interaction entre l'AzF photo-réactif et un résidu voisin. Par une approche biochimique, nous avons montré que ce photo-pontage spécifique impliquait à la fois la sous-unité GluN2A et la sous-unité GluN1. Notre approche électrophysiologique menée sur ovocytes de *Xénope* a montré que ce photo-pontage inter-sous-unités induisait à la fois une baisse de la probabilité d'ouverture du rNMDA et une augmentation de l'affinité du rNMDA pour le glutamate, deux propriétés caractéristiques des états désensibilisés. Nous sommes

donc parvenus à piéger le récepteur dans l'état de "type-désensibilisé" dans lequel il se trouvait lors du traitement UV en présence de zinc.

En se basant sur notre modèle par homologie du dimère d'ABDs GluN1/GluN2A dans la conformation "état désensibilisé" des rAMPA, les différents résultats de cette étude suggèrent que le photo-pontage du rNMDA en présence de zinc intervient entre les lobes inférieurs des ABDs de GluN1 et GluN2A, notamment entre les hélices K de GluN1 et F et G de GluN2A. Cela signifie que, lors de l'inhibition par le zinc des rNDMA GluN1/GluN2A, les lobes inférieurs des ABDs subissent des changements conformationnels qui, d'après notre modèle, se traduisent par la naissance d'une nouvelle interface entre les lobes inférieurs des ABDs du dimère fonctionnel GluN1/GluN2A. Cette interface impliquerait des résidus de l'hélice K de GluN1 et de la boucle de GluN2A comprise entre les hélices F et G.

Nos résultats permettent donc de compléter le modèle proposé par Gielen et al. (2008) pour décrire les changements conformationnels qui accompagnent l'inhibition par le zinc des rNMDAs de type GluN1/GluN2A et mènent à la fermeture du canal alors que les ABDs lient toujours les agonistes (Fig. **2.3.15**). Lorsque le zinc se lie au NTD de GluN2A, il en induit la fermeture, ce qui provoque un écartement des lobes inférieurs des NTDs du dimère "fonctionnel" GluN1/GluN2A. Ce mouvement exerce une tension sur les lobes supérieurs des ABDs qui se séparent. Cette rupture de l'interface entre lobes supérieurs s'accompagne donc de l'apparition d'une nouvelle interface entre les lobes inférieurs des ABDs qui se rapprochent. Ces changements conformationnels provoquent à leur tour un relâchement de la tension exercée par les "linkers" ABD-TMD sur les segments transmembranaires et, par conséquent la fermeture de la porte du canal. Notre étude apporte donc des arguments supplémentaires en faveur d'un état inhibé "zinc-lié" des récepteurs GluN1/GluN2A, structurellement proche de celui des rAMPA désensibilisés (Armstrong et al., 2006).

Dans cette étude nous avons pu mettre à profit les avantages de l'approche par expansion du code génétique. Par rapport à la méthode traditionnelle de pontage disulfure entre des cystéines introduites dans la séquence protéique, l'utilisation d'UAA présente des atouts appréciables. Tout d'abord, déterminer le site d'incorporation de l'UAA dans la chaîne

protéique est moins contraignant que la recherche des sites d'introduction de deux cystéines. En effet, l'AzF pouvant réagir avec divers acides-aminés présents à proximité, nous n'avons pas besoin de faire d'hypothèses précises sur les résidus impliqués dans les interactions. Par ailleurs, la réversibilité des ponts disulfures, leur sensibilité aux agents oxydo-réducteurs, ou encore la réactivité des cystéines qui peuvent former des sites de liaison pour les métaux divalents, peuvent constituer des handicaps lorsqu'on veut étudier les propriétés fonctionnelles du récepteur ainsi modifié (Berkmen et al., 2012). Un des avantages des UAAs est que la liaison covalente formée par l'espèce réactive de l'UAA (par exemple le nitrène issu de l'irradiation de la fonction azide de l'AzF) et la chaîne latérale d'un résidu voisin est irréversible. Enfin, le pontage impliquant un UAA photo-réactif est provoqué, par une exposition aux UVs, contrairement aux ponts disulfures qui se forment souvent spontanément. Il est donc plus facile de contrôler les interactions dans le cas des UAAs.

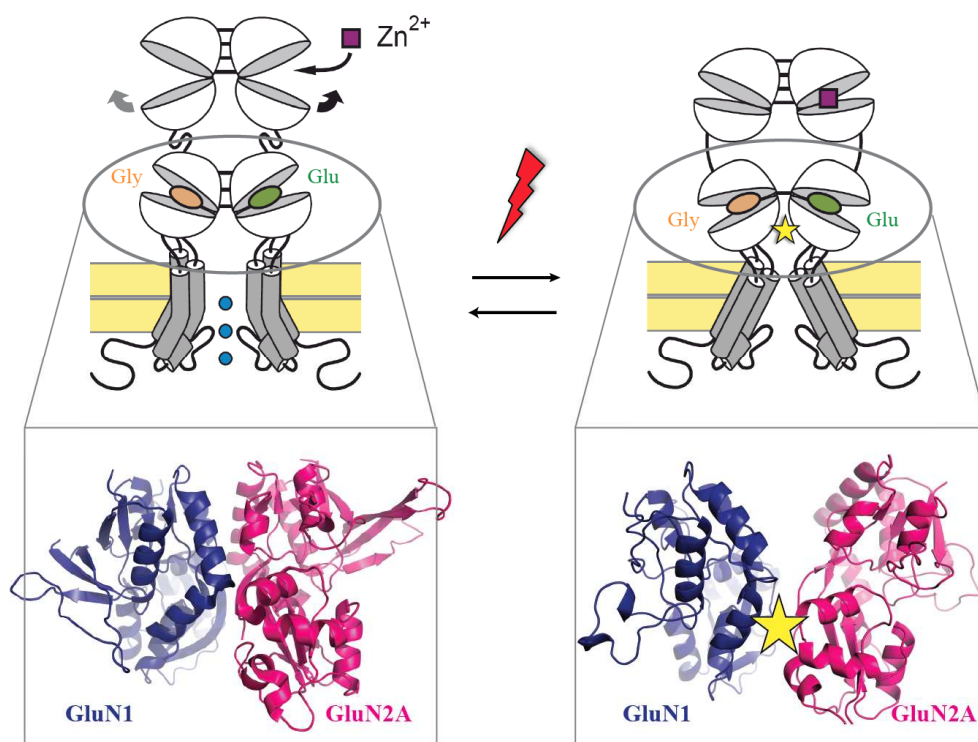


Figure 2.3.15. Schéma-bilan des réarrangements conformationnels des interfaces entre ABDs de GluN1 (rose) et GluN2A (bleu) lors de l'inhibition par le zinc. On observe simultanément la rupture de l'interface entre lobes supérieurs et l'apparition d'une nouvelle entre lobes inférieurs (représentée par une étoile). Cette interface est stabilisée par la liaison covalente formée entre l'AzF de GluN2A et un résidu de GluN1 après exposition aux UVs (éclair rouge).

2.3.4.2. Perspectives de l'étude

Les résultats obtenus dans cette étude sont très prometteurs car les différentes approches, électrophysiologiques et biochimiques, corroborent notre modèle du dimère d'ABDs de GluN1/GluN2A obtenu à partir de la structure de celui du rAMPA désensibilisé. Tout cela confirme donc les analogies conformationnelles entre les rAMPAs qui désensibilisent et les rNMDAs qui sont inhibés par le zinc. Notre objectif, à présent, est de renforcer notre approche biochimique afin de mettre en évidence plus nettement le photo-pontage entre les sous-unités GluN1 et GluN2A. En effet, les bandes de haut poids moléculaire obtenues en western-blots sont de très faible intensité. Nous attribuons cette quantité limitée d'hétérodimères détectés au faible ratio de récepteurs photo-pontés à la membrane plasmique par rapport aux récepteurs totaux, intracellulaires et membranaires (notons que les UVs ne pénètrent probablement que peu à l'intérieur des ovocytes du fait des nombreux pigments juxtamembranaires). Afin de concentrer le nombre de récepteurs fonctionnels photo-pontés, nous réalisons actuellement des western-blots sur des membranes isolées et purifiées, à partir soit d'ovocytes de *Xénope*, soit de cellules HEK.

Pour caractériser de façon encore plus précise le photo-pontage impliquant l'AzF et donc la nouvelle interface créée entre GluN1 et GluN2A, nous avons tenté de déterminer le partenaire d'interaction, sur GluN1, de l'AzF697. Nous nous sommes jusqu'à présent concentrés sur l'hélice K de GluN1. Malheureusement, notre approche par mutagenèse dirigée "classique", consistant à raccourcir la chaîne latérale du partenaire potentiel, pour l'empêcher de réagir avec l'AzF, n'a pas porté ses fruits. D'après la littérature, le nitrène obtenu par irradiation du groupe azide de l'AzF (Tanaka et al. 2008) réagit de façon covalente avec les fonctions -CH et -XH (X : hétéroatome) des chaînes latérales se trouvant à proximité ($d_{C-N^{\circ}} = 2 \text{ à } 5 \text{ \AA}$, Sato et al. 2011 ; Reddington et al., 2013). La réactivité de l'AzF est donc peu spécifique et on peut imaginer que l'AzF, s'il ne peut plus interagir avec son partenaire habituel (dont la chaîne latérale aurait été raccourcie), parviendra à photo-ponter un autre résidu. Si cette nouvelle interaction fige le récepteur dans un état conformationnel identique, il est normal que la photo-inactivation des récepteurs soit toujours observable. Nous devons également envisager d'autres interactions entre l'AzF697 de GluN2A et un résidu de GluN1. D'après notre modèle, des résidus de l'hélice J de GluN1, H780 et E781, qui se trouvent à la

charnière entre les lobes inférieur et supérieur de l'ABD, pourraient être photo-pontés par l'AzF irradié. Cela dépend principalement de l'orientation de l'AzF dans la structure, mais les distances mesurées entre GluN2A-N697 et GluN1-E781 par exemple ($d_{C\alpha-C\alpha}=9.2 \text{ \AA}$) ne sont pas aberrantes. Un pont salin a d'ailleurs été mis en évidence dans la structure du rAMPA-GluA2-S729C, entre le résidu E755 (homologue à GluN1-E781) d'un protomère et le résidu R661 (homologue à GluN2A-N696, résidu voisin de N697) de l'autre. Cette observation souligne la proximité entre l'hélice J d'une sous-unité du dimère et l'hélice F de l'autre dans l'état désensibilisé du rAMPA.

Dans cette étude nous sommes parvenus à piéger le récepteur GluN1/GluN2A dans un état conformationnel particulier grâce à un photo-pontage inter-sous-unités entre les ABDs de GluN1 et GluN2A. Malgré les informations structurales importantes que ce travail a révélées, il ne fournit aucune indication sur les dynamiques réelles du récepteur au cours des processus d'activation, de désactivation, d'inhibition par le zinc, etc. La fluorométrie à potentiel imposé ("Voltage-Clamp Fluorometry" ou VCF), une technique qui combine électrophysiologie, biologie moléculaire, chimie et fluorescence, permettrait d'y remédier (Gandhi & Olcese, 2008 ; Horne & Fedida, 2009). Dans sa version traditionnelle, la VCF utilise des sondes fluorescentes qui se lient de manière covalente aux résidus cystéines introduits dans la protéine et qui émettent une lumière en fonction de leur environnement (Mannuzzu et al., 1996). La mesure de cette lumière émise durant la dépolarisation de la membrane montre les modifications dans le taux d'émission à mesure que l'environnement du résidu marqué change. Cette information permet de corréliser les événements d'ouverture et de fermeture du canal avec le mouvement de régions spécifiques de la protéine, à une résolution temporelle de l'ordre de la nanoseconde. Utilisée d'abord pour examiner les mouvements d'activation des canaux potassiques *Shaker* (Vaid et al. 2008), la VCF est devenue une technique très précieuse pour comprendre le mécanisme d'ouverture et de fermeture des canaux ioniques, sensibles au voltage ou aux ligands (LGICs). Néanmoins l'étude de cette technique est limitée à des sites accessibles, afin de pouvoir accrocher facilement les fluorophores aux cystéines. L'utilisation d'un UAA fluorescent tel que l'Anap, permet de remédier à ce problème (Kalstrup & Blunk, 2013). Dans le cas des rNMDAs, l'incorporation de l'Anap à la position GluN2A-N697, puis l'étude de sa fluorescence au cours de l'activation et de l'inhibition par le zinc du récepteur mutant, permettraient de corréliser de façon précise les mouvements des ABDs de GluN1 et GluN2A avec l'état dans lequel se trouve le récepteur.

Conclusion Générale

Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation couplée d'analyses structurales (notamment par microscopie électronique et par cristallographie) et d'études fonctionnelles (par électrophysiologie), a permis des avancées considérables dans le domaine des récepteurs-canaux du glutamate (iGluRs) et de l'étude des relations structure-fonction. La publication, en 2009, de la structure d'un récepteur AMPA (rAMPA) homomérique (contenant GluA2) a marqué l'histoire des iGluRs, en révélant l'organisation des quatre sous-unités dans un récepteur tétramérique entier. Il est en effet très délicat de cristalliser une protéine transmembranaire, c'est pourquoi, jusqu'à présent, seules les structures de domaines isolés solubles (domaines de liaison des agonistes ABDs, domaines N-terminaux NTDs), monomériques ou oligomériques, étaient disponibles. Cette structure cristallographique permet de décrire, pour la première fois, les interactions entre les divers modules/domaines (ABDs, NTDs et domaines transmembranaires TMDs) formant les iGluRs, ce qui, sans structure, ne peuvent être déduites que d'études fonctionnelles. Cette structure a non seulement confirmé les données structurales obtenues pour les domaines isolés mais a aussi permis de décrire l'arrangement des sous-unités et des domaines dans l'assemblage tétramérique et de révéler de nouvelles interfaces.

Nous avons exploité cette structure afin de déterminer l'arrangement des quatre sous-unités d'un rNMDA GluN1/GluN2A autour du pore. En effet, s'il est admis que l'unité fonctionnelle des rNDMA est l'hétérodimère, l'arrangement de deux de ces hétérodimères pour former un complexe tétramérique a longtemps fait débat. Par une approche combinant modélisation par homologie, électrophysiologie et biochimie, nous avons montré que dans un rNMDA entier GluN1/GluN2, l'arrangement des sous-unités est alterné (de type GluN1/GluN2/GluN1/GluN2) avec les sous-unités GluN1, proximales par rapport à l'axe de symétrie des ABDs, qui forment l'interface de tétramérisation de ces domaines. Nos résultats suggèrent également un rôle essentiel de cette interface dans les processus de « gating » du récepteur.

Déterminer l'arrangement tétramérique d'un rNMDA hétéromère est d'autant plus important que l'asymétrie révélée par la structure du rAMPA-GluA2 implique l'existence de conformations distinctes des sous-unités au sein du récepteur. Ainsi, toujours en prenant le rAMPA comme modèle, on peut déduire de l'arrangement 1-2-1-2 d'un rNMDA, que les sous-unités GluN1, internes au niveau des ABDs, adoptent une conformation différente des sous-unités GluN2, qui sont externes. Cette non-équivalence conformationnelle des sous-unités GluN1 et GluN2 sous-entend des contributions différentes aux mécanismes d'activation, de désactivation et de désensibilisation. Cette hypothèse a d'ailleurs été corroborée ces dernières années par différentes études fonctionnelles (Sobolevsky et al., 2007 ; Banke et al., 2003 ; Blanke et al., 2008 ; Kussius et al., 2009, Watanabe et al., 2002). En particulier, ces auteurs ont montré que, lors de l'activation, les mouvements des "linkers" reliant les segments transmembranaires aux ABDs différaient entre les sous-unités GluN1 et GluN2 et contribuaient ainsi de façon plus ou moins importante au "gating". Malgré ces nombreux arguments en faveur d'un arrangement alterné des ABDs d'un récepteur GluN1/GluN2, certains défendent encore la thèse d'une organisation 1-1-2-2 des sous-unités (Balasuriya et al., 2013). Dans quelle mesure est-il possible d'avoir différentes populations de récepteurs avec des arrangements différents ? Si cette hypothèse se vérifie, quels sont alors les critères déterminant la nature de la population dans une région donnée du cerveau ? Enfin, quel est l'intérêt d'une telle discrimination ? Telles sont les questions qu'il reste à résoudre pour déterminer définitivement l'arrangement des sous-unités autour du pore d'un rNDMA.

Connaissant l'arrangement des ABDs autour du pore, il est tentant à présent de vouloir déterminer l'organisation des NTDs de GluN1 et GluN2 au niveau N-terminal. Une seule structure d'un tétramère de NTDs (GluN1/GluN2B) a été résolue à ce jour (Karakas et al., 2011). L'agencement des NTDs des quatre sous-unités dans cette structure est conforme à ce qui est observé pour le rAMPA-GluA2. Des différences sont à noter malgré tout, notamment concernant l'interface de tétramérisation qui est assurée, dans le cas des rNMDAs, par les lobes supérieurs, et non inférieurs (rAMPAs, rKAs), des NTDs. Dans ce tétramère cristallisé, les sous-unités GluN2B sont proximales par rapport à l'axe de symétrie des NTDs, tandis que les sous-unités GluN1 sont distales. Certes, cette structure nécessite d'être confirmée par des études fonctionnelles. Néanmoins, elle est en parfaite adéquation avec la structure cristallographique du rAMPA (Sobolevsky et al., 2009 ; Farina et al., 2011). En particulier, l'arrangement alterné des sous-unités au niveau des ABDs et des NTDs, avec les sous-unités

proximales, qui sont GluN1 au niveau des ABDs et GluN2 au niveau des NTDs, s'il est correct, sous-entendrait que le « domain swapping » observé dans les rAMPA est également nécessaire dans les rNMDAs. Cette permutation des sous-unités formant l'hétérodimère fonctionnel, entre ABDs et NTDs, est une caractéristique essentielle de la rupture de symétrie observée chez le rAMPA.

A défaut d'avoir une structure cristallographique d'un rNMDA hétéromérique entier, d'autres techniques permettent d'en déduire les structures, les mouvements conformationnels, etc. L'une d'entre elles connaît actuellement des progrès notoires. Il s'agit de l'expansion du code génétique dans un organisme donné, par incorporation d'acide-aminé non-naturel (UAA) dans la séquence du gène codant pour la protéine d'intérêt. Cette approche "tout génétique" est extrêmement innovante car elle permet d'introduire dans une protéine de nouvelles fonctions chimiques. Elle est basée sur l'efficacité de paires orthogonales ARNt-suppresseur/aminoacyl-ARNt-synthétase, qui permettent d'incorporer un UAA après lecture d'un codon stop ambre. Un des défis à l'heure actuelle est de pouvoir utiliser un très grand nombre d'enzymes ARNt-synthétase différentes, afin d'incorporer une plus grande variété d'UAAs. Encore limité il y a peu, le nombre d'UAAs pouvant être introduit dans une chaîne polypeptidique, par la technique "tout génétique", a considérablement augmenté ces dernières années (Liu & Schultz, 2010). Nous avons montré que l'expansion du code génétique était réalisable dans l'ovocyte de *Xénope* et que l'application de cette méthode aux rNMDAs permettait d'en étudier les relations structure-fonction. En créant des rNDMA sensibles à la lumière, capables de s'inactiver en présence d'UV, nous avons ainsi démontré tout l'intérêt de cette nouvelle technique. En effet, beaucoup d'applications, permettant d'étudier la structure d'un récepteur-canal (et donc membranaire), la dynamique, les changements conformationnels lors de l'activation, etc, sont envisageables. Notre défi à présent est de tirer profit de l'incorporation d'UAAs, notamment de l'AzF, dans le rNDMA, afin de le rendre photosensible, mais cette fois-ci de façon réversible. L'une des idées est d'attacher à l'AzF une sonde infrarouge ou fluorescente par des réactions de conjugaison (Huber et al., 2013), comme la « click chemistry » ([3+2] cycloaddition). Une deuxième orientation est celle des PTLs (pour Photoisomerisable Tethered Ligands), qui seraient composés d'un analogue du glutamate, lié à la chaîne latérale "azobenzène" d'un UAA incorporé à la position choisie de notre protéine (Bose et al., 2006). L'application de lumière de longueur d'onde donnée sur ces ligands PTLs les fait osciller d'une conformation *cis* à *trans*, l'une d'entre elles conduisant

à l'activation du récepteur. Ce nouvel outil, qui permet d'incorporer un UAA à n'importe quel site d'une protéine, est un atout indéniable pour l'étude de protéines membranaires comme les récepteurs-canaux. Ainsi, en attendant la structure cristallographique d'un rNMDA entier, l'incorporation d'UAA dans une des sous-unités du récepteur, nous a permis d'étudier et faire des hypothèses sur les relations entre les domaines NTDs et ABDs, notamment sur les mécanismes conduisant à l'inhibition du récepteur après la liaison du zinc sur le NTD de GluN2A, via des changements conformationnels des ABDs.

Les études des relations structure-fonction des récepteurs canaux sont essentielles afin de déterminer le rôle de chaque domaine, de chaque sous-unité, dans les processus d'activation, de désactivation, de désensibilisation et de modulation par des ligands, endogènes mais aussi synthétiques, à visée thérapeutique notamment. La combinaison des deux techniques que nous avons utilisées, étude de pontages disulfure et photo-réactivité d'un rNMDA *via* l'incorporation d'un UAA, nous permettent, en attendant la structure cristallographique d'un rNDMA entier, de faire la lumière sur de telles relations et interactions entre les différents éléments d'un récepteur.

Liste des abréviations

aaRS	Aminoacyl-ARNt synthétase
ABD	Domaine de liaison des agonistes
ACh	Acétylcholine
AFM	Microscopie à Force Atomique
AMPA	Acide (S)- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionique
ATP	Adenosine-5'-triphosphate
AzF	<i>p</i> -azido-L-Phénylalanine
Bpa	<i>p</i> -benzoyl-L-phenylalanine
CNQX	6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione
CTD	Domaine C-terminal
CTZ	Cyclothiazide
D-AP5	Acide D-2-amino-5-phosphonopentanoïque
DNQX	6, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione
DTNB	Acide 5,5'-dithiolbis(2-nitrobenzoïque)
DTE	Dithioérythritol
DTPA	Acide diéthylènetriamine-pentaacétique
DTT	Dithiotréitol
EC₅₀	Concentration produisant 50 % de l'activation maximale
EPSC	Courant post-synaptique exciteur
FRET	Transfert d'énergie par résonance de Förster
GABA	Acide -aminobutyrique
GFP	Protéine fluorescente verte
HEK	Rein embryonnaire humain
iGluR	Récepteur ionotropique du glutamate
LGIC	Récepteur canal ou ionotropique
LIVBP	Leucine/isoleucine/valine-binding protein
LL	Lobe supérieur
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentiation à long terme
mGluR	Récepteur métabotrope du glutamate
MTS	Méthane-thiosulfonate
MTSET	Méthane-thiosulfonate de 2-(triméthylammonium)éthyle
nAChR	Récepteur nicotinique à acétylcholine
NBQX	2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline-2,3-dione
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NTD	Domaine N-terminal
PBP	Protéine bactérienne périplasmique
PIRK	Canal potassique à rectification entrante photo-activable
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C

P_o	Probabilité d'ouverture
PTL	Ligand attaché photo-sensible
QBP	Protéine de liaison de la glutamine
RE	Réticulum endoplasmique
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
rAMPA	Récepteur AMPA
rKA	Récepteur Kainate
rNMDA	Récepteur NMDA
SNC	Système nerveux central
TMD	Domaine transmembranaire
UAA	Acide-aminé non naturel
UL	Lobe supérieur
VCF	Fluorométrie à potentiel imposé
wt	Wild-type (de type sauvage)

Références

- Acker TM, Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Jensen HS, Burger PB, Mullasseril P, Snyder JP, Liotta DC, Traynelis SF (2011) Mechanism for noncompetitive inhibition by novel GluN2C/D N-methyl-D-aspartate receptor subunit-selective modulators. *Mol Pharmacol* 80: 782-795
- Agboh KC, Webb TE, Evans RJ, Ennion SJ (2004) Functional characterization of a P2X receptor from *Schistosoma mansoni*. *J Biol Chem* 279: 41650-41657
- Ahmed AH, Thompson MD, Fenwick MK, Romero B, Loh AP, Jane DE, Sondermann H, Oswald RE (2009) Mechanisms of antagonism of the GluR2 AMPA receptor: structure and dynamics of the complex of two willardiine antagonists with the glutamate binding domain. *Biochemistry* 48: 3894-3903
- Ahmed AH, Ptak CP, Fenwick MK, Hsieh CL, Weiland GA, Oswald RE (2013) Dynamics of cleft closure of the GluA2 ligand-binding domain in the presence of full and partial agonists revealed by hydrogen-deuterium exchange. *J Biol Chem* 288: 27658-27666
- Ahmed AH, Wang S, Chuang HH, Oswald RE (2011) Mechanism of AMPA receptor activation by partial agonists: disulfide trapping of closed lobe conformations. *J Biol Chem* 286: 35257-35266
- Ai HW, Lee JW, Schultz PG (2010) A method to site-specifically introduce methyllysine into proteins in *E. coli*. *Chem Commun (Camb)* 46: 5506-5508
- Aizenman E, Hartnett KA, Reynolds IJ (1990) Oxygen free radicals regulate NMDA receptor function via a redox modulatory site. *Neuron* 5: 841-846
- Aizenman E, Lipton SA, Loring RH (1989) Selective modulation of NMDA responses by reduction and oxidation. *Neuron* 2: 1257-1263
- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A (1994) Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the alpha subunit. *Neuron* 13: 919-927
- Akabas MH, Stauffer DA, Xu M, Karlin A (1992) Acetylcholine receptor channel structure probed in cysteine-substitution mutants. *Science* 258: 307-310
- Akazawa C, Shigemoto R, Bessho Y, Nakanishi S, Mizuno N (1994) Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol* 347: 150-160
- Almeida OP (2005) Can we prevent Alzheimer's disease? *Rev Bras Psiquiatr* 27: 264-265
- Anggono V, Haganir RL (2012) Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Curr Opin Neurobiol* 22: 461-469
- Antonio LS, Stewart AP, Xu XJ, Varanda WA, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2011) P2X4 receptors interact with both P2X2 and P2X7 receptors in the form of homotrimers. *Br J Pharmacol* 163: 1069-1077
- Armstrong N, Gouaux E (2000) Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron* 28: 165-181
- Armstrong N, Jasti J, Beich-Frandsen M, Gouaux E (2006) Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell* 127: 85-97
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E (1998) Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395: 913-91

- Ascher P, Nowak L (1988) The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J Physiol* 399: 247-266
- Aschrafi A, Sadtler S, Niculescu C, Rettinger J, Schmalzing G (2004) Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. *J Mol Biol* 342: 333-343
- Atlason PT, Garside ML, Meddows E, Whiting P, McIlhinney RA (2007) N-Methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit NR1 forms the substrate for oligomeric assembly of the NMDA receptor. *J Biol Chem* 282: 25299-25307
- Attwell D, Gibb A (2005) Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 6: 841-84
- Auerbach D, Thaminy S, Hottiger MO, Stajlar I (2002) The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. *Proteomics* 2: 611-623
- Ayalon G, Segev E, Elgavish S, Stern-Bach Y (2005) Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem* 280: 15053-15060
- Ayalon G, Stern-Bach Y (2001) Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron* 31: 103-113
- Azevedo FA, Carvalho LR, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti RE, Leite RE, Jacob Filho W, Lent R, Herculano-Houzel S (2009) Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol* 513: 532-541
- Bain JD, Switzer C, Chamberlin AR, Benner SA (1992) Ribosome-mediated incorporation of a non-standard amino acid into a peptide through expansion of the genetic code. *Nature* 356: 537-539
- Balannik V, Menniti FS, Paternain AV, Lerma J, Stern-Bach Y (2005) Molecular mechanism of AMPA receptor noncompetitive antagonism. *Neuron* 48: 279-288
- Balasuriya D, Goetze TA, Barrera NP, Stewart AP, Suzuki Y, Edwardson JM (2013) alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) and N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors adopt different subunit arrangements. *J Biol Chem* 288: 21987-21998
- Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci* 7: 1381-1386
- Banke TG, Dravid SM, Traynelis SF (2005) Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci* 25: 42-51
- Banke TG, Traynelis SF (2003) Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci* 6: 144-152
- Bannykh SI, Rowe T, Balch WE (1996) The organization of endoplasmic reticulum export complexes. *J Cell Biol* 135: 19-35
- Barbour B (2001) An evaluation of synapse independence. *J Neurosci* 21: 7969-7984
- Barbour B, Hausser M (1997) Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends Neurosci* 20: 377-384
- Barnes NM, Hales TG, Lummis SC, Peters JA (2009) The 5-HT3 receptor--the relationship between structure and function. *Neuropharmacology* 56: 273-284
- Barrera NP, Edwardson JM (2008) The subunit arrangement and assembly of ionotropic receptors. *Trends Neurosci* 31: 569-576
- Barrera NP, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2007) The stoichiometry of P2X2/6 receptor heteromers depends on relative subunit expression levels. *Biophys J* 93: 505-512

- Barrera NP, Ormond SJ, Henderson RM, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2005) Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *J Biol Chem* 280: 10759-10765
- Bartels E, Wassermann NH, Erlanger BF (1971) Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68: 1820-1823
- Batchelor AM, Garthwaite J (1997) Frequency detection and temporally dispersed synaptic signal association through a metabotropic glutamate receptor pathway. *Nature* 385: 74-77
- Bavan S, Straub VA, Blaxter ML, Ennion SJ (2009) A P2X receptor from the tardigrade species *Hypsibius dujardini* with fast kinetics and sensitivity to zinc and copper. *BMC Evol Biol* 9: 17
- Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW (2009) Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci* 29: 12757-12763
- Belforte JE, Zsiros V, Sklar ER, Jiang Z, Yu G, Li Y, Quinlan EM, Nakazawa K (2010) Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nat Neurosci* 13: 76-83
- Bennett MR (2000) The concept of long term potentiation of transmission at synapses. *Prog Neurobiol* 60: 109-137
- Benveniste M, Mayer ML (1993) Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol* 464: 131-163
- Berkmen M (2012) Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein expression and purification* 82: 240-251
- Bernard A, Khrestchatsky M (1994) Assessing the extent of RNA editing in the TMII regions of GluR5 and GluR6 kainate receptors during rat brain development. *J Neurochem* 62: 2057-2060
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology* 2: 326-332
- Bertrand D, Gopalakrishnan M (2007) Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Pharmacol* 74: 1155-1163
- Bettler B, Boulter J, Hermans-Borgmeyer I, O'Shea-Greenfield A, Deneris ES, Moll C, Borgmeyer U, Hollmann M, Heinemann S (1990) Cloning of a novel glutamate receptor subunit, GluR5: expression in the nervous system during development. *Neuron* 5: 583-595
- Bettler B, Egebjerg J, Sharma G, Pecht G, Hermans-Borgmeyer I, Moll C, Stevens CF, Heinemann S (1992) Cloning of a putative glutamate receptor: a low affinity kainate-binding subunit. *Neuron* 8: 257-265
- Bianco A, Townsley FM, Greiss S, Lang K, Chin JW (2012) Expanding the genetic code of *Drosophila melanogaster*. *Nat Chem Biol* 8: 748-750
- Bidoret C, Ayon A, Barbour B, Casado M (2009) Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 14126-14131
- Birdsey-Benson A, Gill A, Henderson LP, Madden DR (2010) Enhanced Efficacy without Further Cleft Closure: Reevaluating Twist as a Source of Agonist Efficacy in AMPA Receptors. *J Neurosci* 30: 1463-1470
- Blackstone C, Murphy TH, Moss SJ, Baraban JM, Huganir RL (1994) Cyclic AMP and synaptic activity-dependent phosphorylation of AMPA-preferring glutamate receptors. *J Neurosci* 14: 7585-7593
- Blanke ML, VanDongen AM (2008) The NR1 M3 domain mediates allosteric coupling in the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* 74: 454-465

- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361: 31-39
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18: 1723-1729
- Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux JP, Delarue M, Corringer PJ (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457: 111-114
- Bocquet N, Prado de Carvalho L, Cartaud J, Neyton J, Le Poupon C, Taly A, Grutter T, Changeux JP, Corringer PJ (2007) A prokaryotic proton-gated ion channel from the nicotinic acetylcholine receptor family. *Nature* 445: 116-119
- Bonsi P, Cuomo D, De Persis C, Centonze D, Bernardi G, Calabresi P, Pisani A (2005) Modulatory action of metabotropic glutamate receptor (mGluR) 5 on mGluR1 function in striatal cholinergic interneurons. *Neuropharmacology* 49 Suppl 1: 104-113
- Bordet R, Ouk T, Onteniente B, Charriaut-Marlangue C, Heurteaux C (2009) [Cerebral ischaemia: tomorrow's therapeutic tracks]. *Med Sci (Paris)* 25: 847-854
- Borgdorff AJ, Choquet D (2002) Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* 417: 649-653
- Borschel WF, Murthy SE, Kasperek EM, Popescu GK (2011) NMDA receptor activation requires remodelling of intersubunit contacts within ligand-binding heterodimers. *Nat Commun* 2: 498
- Bose M, Groff D, Xie J, Brustad E, Schultz PG (2006) The incorporation of a photoisomerizable amino acid into proteins in *E. coli*. *J Am Chem Soc* 128: 388-389
- Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron* 15: 453-462
- Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M, Sirinathsinghji D, Hill RG, Rupniak NM (1999) Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* 38: 611-623
- Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D (1994) New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-523
- Bredt DS, Nicoll RA (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses. *Neuron* 40: 361-379
- Browne LE, Cao L, Broomhead HE, Bragg L, Wilkinson WJ, North RA (2011) P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci* 14: 17-18
- Burnashev N (1996) Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6: 311-317
- Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B (1992a) Divalent ion permeability of AMPA receptor channels is dominated by the edited form of a single subunit. *Neuron* 8: 189-198
- Burnashev N, Schoepfer R, Monyer H, Ruppertsberg JP, Gunther W, Seeburg PH, Sakmann B (1992b) Control by asparagine residues of calcium permeability and magnesium blockade in the NMDA receptor. *Science* 257: 1415-1419
- Burnashev N, Zhou Z, Neher E, Sakmann B (1995) Fractional calcium currents through recombinant GluR channels of the NMDA, AMPA and kainate receptor subtypes. *J Physiol* 485 (Pt 2): 403-418
- Careaga CL, Falke JJ (1992) Thermal motions of surface alpha-helices in the D-galactose chemosensory receptor. Detection by disulfide trapping. *J Mol Biol* 226: 1219-1235

- Carnally SM, Dev HS, Stewart AP, Barrera NP, Van Bemmelen MX, Schild L, Henderson RM, Edwardson JM (2008) Direct visualization of the trimeric structure of the ASIC1a channel, using AFM imaging. *Biochem Biophys Res Commun* 372: 752-755
- Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F, Lloyd KG, Arbilla S, Zivkovic B, MacKenzie ET, et al. (1988) Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* 247: 1222-1232
- Chang HR, Kuo CC (2008) The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci* 28: 1546-1556
- Changeux JP (2010) Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice. *Nat Rev Neurosci* 11: 389-401
- Changeux JP, Kasai M, Lee CY (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 67: 1241-1247
- Charbon G, Wang J, Brustad E, Schultz PG, Horwich AL, Jacobs-Wagner C, Chapman E (2011) Localization of GroEL determined by in vivo incorporation of a fluorescent amino acid. *Bioorg Med Chem Lett* 21: 6067-6070
- Chatterton JE, Awobuluyi M, Premkumar LS, Takahashi H, Talantova M, Shin Y, Cui J, Tu S, Sevarino KA, Nakanishi N, Tong G, Lipton SA, Zhang D (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature* 415: 793-798
- Chaudhry C, Plested AJ, Schuck P, Mayer ML (2009a) Energetics of glutamate receptor ligand binding domain dimer assembly are modulated by allosteric ions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 12329-12334
- Chaudhry C, Weston MC, Schuck P, Rosenmund C, Mayer ML (2009b) Stability of ligand-binding domain dimer assembly controls kainate receptor desensitization. *EMBO J* 28: 1518-1530
- Chazot PL, Stephenson FA (1997) Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J Neurochem* 69: 2138-2144
- Chen GQ, Cui C, Mayer ML, Gouaux E (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature* 402: 817-821
- Chen N, Moshaver A, Raymond LA (1997) Differential sensitivity of recombinant N-methyl-D-aspartate receptor subtypes to zinc inhibition. *Mol Pharmacol* 51: 1015-1023
- Chen PR, Groff D, Guo J, Ou W, Cellitti S, Geierstanger BH, Schultz PG (2009) A facile system for encoding unnatural amino acids in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 4052-4055
- Chenard BL, Menniti FS (1999) Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des* 5: 381-404
- Cheng SS, Heintz N (1997) Massive loss of mid- and hindbrain neurons during embryonic development of homozygous *lurcher* mice. *J Neurosci* 17: 2400-2407
- Chin JW, Cropp TA, Anderson JC, Mukherji M, Zhang Z, Schultz PG (2003) An expanded eukaryotic genetic code. *Science* 301: 964-967
- Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM (2001) NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci* 22: 636-642
- Choi Y, Chen HV, Lipton SA (2001) Three pairs of cysteine residues mediate both redox and Zn²⁺ modulation of the nmda receptor. *J Neurosci* 21: 392-400

- Choi YB, Lipton SA (1999) Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn²⁺ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* 23: 171-180
- Choi YB, Lipton SA (2000) Redox modulation of the NMDA receptor. *Cell Mol Life Sci* 57: 1535-1541
- Choi YB, Tenneti L, Le DA, Ortiz J, Bai G, Chen HS, Lipton SA (2000) Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nat Neurosci* 3: 15-21
- Christine CW, Choi DW (1990) Effect of zinc on NMDA receptor-mediated channel currents in cortical neurons. *J Neurosci* 10: 108-116
- Chu Z, Hablitz JJ (2000) Quisqualate induces an inward current via mGluR activation in neocortical pyramidal neurons. *Brain Res* 879: 88-92
- Clarke RJ, Glasgow NG, Johnson JW (2013) Mechanistic and structural determinants of NMDA receptor voltage-dependent gating and slow Mg²⁺ unblock. *J Neurosci* 33: 4140-4150
- Clayton A, Siebold C, Gilbert RJ, Sutton GC, Harlos K, McIlhinney RA, Jones EY, Aricescu AR (2009) Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J Mol Biol* 392: 1125-1132
- Cline DJ, Redding SE, Brohawn SG, Psathas JN, Schneider JP, Thorpe C (2004) New water-soluble phosphines as reductants of peptide and protein disulfide bonds: reactivity and membrane permeability. *Biochemistry* 43: 15195-15203
- Coddou C, Stojilkovic SS, Huidobro-Toro JP (2011) Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Rev Neurosci* 22: 335-354
- Conn PJ, Pin JP (1997) Pharmacology and functions of metabotropic glutamate receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 205-237
- Connolly CN, Krishek BJ, McDonald BJ, Smart TG, Moss SJ (1996) Assembly and cell surface expression of heteromeric and homomeric gamma-aminobutyric acid type A receptors. *J Biol Chem* 271: 89-96
- Contractor A, Mulle C, Swanson GT (2011) Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci* 34: 154-163
- Copits BA, Swanson GT (2012) Dancing partners at the synapse: auxiliary subunits that shape kainate receptor function. *Nat Rev Neurosci* 13: 675-686
- Corringer PJ, Baaden M, Bocquet N, Delarue M, Dufresne V, Nury H, Prevost M, Van Renterghem C (2010) Atomic structure and dynamics of pentameric ligand-gated ion channels: new insight from bacterial homologues. *J Physiol* 588: 565-572
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 431-458
- Corringer PJ, Poitevin F, Prevost MS, Sauguet L, Delarue M, Changeux JP (2012) Structure and pharmacology of pentameric receptor channels: from bacteria to brain. *Structure* 20: 941-956
- Craig AM, Blackstone CD, Haganir RL, Banker G (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10: 1055-1068
- Cropp TA, Schultz PG (2004) An expanding genetic code. *Trends Genet* 20: 625-630
- Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M (2001) NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 11: 327-335
- Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* 2004: re16

- Culotta E, Koshland DE, Jr. (1992) NO news is good news. *Science* 258: 1862-1865
- Curtis DR, Watkins JC (1960) The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6: 117-141
- Daggett KA, Sakmar TP (2011) Site-specific in vitro and in vivo incorporation of molecular probes to study G-protein-coupled receptors. *Curr Opin Chem Biol* 15: 392-398
- Dai J, Zhou HX (2013) An NMDA receptor gating mechanism developed from MD simulations reveals molecular details underlying subunit-specific contributions. *Biophys J* 104: 2170-2181
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng XY, Lai MZ, Dessain SK, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R, Lynch DR (2008) Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 7: 1091-1098
- Dalmau J, Lancaster E, Martinez-Hernandez E, Rosenfeld MR, Balice-Gordon R (2011) Clinical experience and laboratory investigations in patients with anti-NMDAR encephalitis. *Lancet Neurol* 10: 63-74
- Daniels BA, Andrews ED, Aurousseau MR, Accardi MV, Bowie D (2013) Crosslinking the ligand-binding domain dimer interface locks kainate receptors out of the main open state. *J Physiol* 591: 3873-3885
- Das U, Kumar J, Mayer ML, Plested AJ (2010) Domain organization and function in GluK2 subtype kainate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 8463-8468
- Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF (1999) The 5-HT_{3B} subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 397: 359-363
- Davis L, Chin JW (2012) Designer proteins: applications of genetic code expansion in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 168-182
- Dawe GB, Musgaard M, Andrews ED, Daniels BA, Aurousseau MR, Biggin PC, Bowie D (2013) Defining the structural relationship between kainate-receptor deactivation and desensitization. *Nat Struct Mol Biol* 20: 1054-1061
- De Felice FG, Velasco PT, Lambert MP, Viola K, Fernandez SJ, Ferreira ST, Klein WL (2007) Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *J Biol Chem* 282: 11590-11601
- DeWolf WC (1977) Sydney Ringer (1835-1910). *Invest Urol* 14: 500-501
- Diaz-Hernandez M, Cox JA, Migita K, Haines W, Egan TM, Voigt MM (2002) Cloning and characterization of two novel zebrafish P2X receptor subunits. *Biochem Biophys Res Commun* 295: 849-853
- Didier M, Xu M, Berman SA, Bursztajn S (1995) Differential expression and co-assembly of NMDA zeta 1 and epsilon subunits in the mouse cerebellum during postnatal development. *Neuroreport* 6: 2255-2259
- Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 51: 7-61
- Dong H, Zhou HX (2011) Atomistic mechanism for the activation and desensitization of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nat Commun* 2: 354
- Dougherty DA (1996) Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271: 163-168
- Doyle DA, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69-77
- Dravid SM, Prakash A, Traynelis SF (2008) Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *J Physiol* 586: 4425-4439

- Durand GM, Bennett MV, Zukin RS (1993) Splice variants of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 identify domains involved in regulation by polyamines and protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6731-6735
- Dutta A, Shrivastava IH, Sukumaran M, Greger IH, Bahar I (2012) Comparative dynamics of NMDA- and AMPA-glutamate receptor N-terminal domains. *Structure* 20: 1838-1849
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415: 287-294
- Egebjerg J, Bettler B, Hermans-Borgmeyer I, Heinemann S (1991) Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. *Nature* 351: 745-748
- Egebjerg J, Heinemann SF (1993) Ca²⁺ permeability of unedited and edited versions of the kainate selective glutamate receptor GluR6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 755-759
- Ehlers MD, Mammen AL, Lau LF, Hagan RL (1996) Synaptic targeting of glutamate receptors. *Current opinion in cell biology* 8: 484-489
- Ellgaard L, Helenius A (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 181-191
- Endoh T (2004) Characterization of modulatory effects of postsynaptic metabotropic glutamate receptors on calcium currents in rat nucleus tractus solitarius. *Brain Res* 1024: 212-224
- Engel AG, Ohno K, Shen XM, Sine SM (2003) Congenital myasthenic syndromes: multiple molecular targets at the neuromuscular junction. *Ann N Y Acad Sci* 998: 138-160
- England PM, Lester HA, Dougherty DA (1999) Mapping disulfide connectivity using backbone ester hydrolysis. *Biochemistry* 38: 14409-14415
- Erreger K, Chen PE, Wyllie DJ, Traynelis SF (2004) Glutamate receptor gating. *Crit Rev Neurobiol* 16: 187-224
- Erreger K, Dravid SM, Banke TG, Wyllie DJ, Traynelis SF (2005) Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol* 563: 345-358
- Erreger K, Traynelis SF (2005) Allosteric interaction between zinc and glutamate binding domains on NR2A causes desensitization of NMDA receptors. *J Physiol* 569: 381-393
- Erreger K, Traynelis SF (2008) Zinc inhibition of rat NR1/NR2A N-methyl-D-aspartate receptors. *J Physiol* 586: 763-778
- Evans RJ (2009) Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. *Eur Biophys J* 38: 319-327
- Everts I, Villmann C, Hollmann M (1997) N-Glycosylation is not a prerequisite for glutamate receptor function but is essential for lectin modulation. *Mol Pharmacol* 52: 861-873
- Farina AN, Blain KY, Maruo T, Kwiatkowski W, Choe S, Nakagawa T (2011) Separation of domain contacts is required for heterotetrameric assembly of functional NMDA receptors. *J Neurosci* 31: 3565-3579
- Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, Neyton J (2000) Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn²⁺ binding to NMDA receptors. *Neuron* 25: 683-694
- Fehrentz T, Schonberger M, Trauner D (2011) Optochemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl* 50: 12156-12182
- Fisher JL, Mott DD (2011) Distinct functional roles of subunits within the heteromeric kainate receptor. *J Neurosci* 31: 17113-17122
- Förster T (1948) Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* 437: 55–75

- Fortin DL, Dunn TW, Kramer RH (2011) Engineering light-regulated ion channels. *Cold Spring Harbor protocols* 2011: 579-585
- Fountain SJ, Cao L, Young MT, North RA (2008) Permeation properties of a P2X receptor in the green algae *Ostreococcus tauri*. *J Biol Chem* 283: 15122-15126
- Fountain SJ, Parkinson K, Young MT, Cao L, Thompson CR, North RA (2007) An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 448: 200-203
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Thompson RB (2000) Importance of zinc in the central nervous system: the zinc-containing neuron. *J Nutr* 130: 1471S-1483S
- Frerking M, Schmitz D, Zhou Q, Johansen J, Nicoll RA (2001) Kainate receptors depress excitatory synaptic transmission at CA3-->CA1 synapses in the hippocampus via a direct presynaptic action. *J Neurosci* 21: 2958-2966
- Fukata Y, Tzingounis AV, Trinidad JC, Fukata M, Burlingame AL, Nicoll RA, Brecht DS (2005) Molecular constituents of neuronal AMPA receptors. *J Cell Biol* 169: 399-404
- Furukawa H (2012) Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains. *J Physiol* 590: 63-72
- Furukawa H, Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* 22: 2873-2885
- Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005) Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* 438: 185-192
- Gallo V, Upson LM, Hayes WP, Vyklicky L, Jr., Winters CA, Buonanno A (1992) Molecular cloning and development analysis of a new glutamate receptor subunit isoform in cerebellum. *J Neurosci* 12: 1010-1023
- Gandhi CS, Olcese R (2008) The voltage-clamp fluorometry technique. *Methods in molecular biology* 491: 213-231
- Gardoni F, Picconi B, Ghiglieri V, Polli F, Bagetta V, Bernardi G, Cattabeni F, Di Luca M, Calabresi P (2006) A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. *J Neurosci* 26: 2914-2922
- Gardoni F, Sgobio C, Pendolino V, Calabresi P, Di Luca M, Picconi B (2012) Targeting NR2A-containing NMDA receptors reduces L-DOPA-induced dyskinesias. *Neurobiol Aging* 33: 2138-2144
- Gautier A, Deiters A, Chin JW (2011) Light-activated kinases enable temporal dissection of signaling networks in living cells. *J Am Chem Soc* 133: 2124-2127
- Gautier A, Nguyen DP, Lusic H, An W, Deiters A, Chin JW (2010) Genetically encoded photocontrol of protein localization in mammalian cells. *J Am Chem Soc* 132: 4086-4088
- Gever JR, Cockayne DA, Dillon MP, Burnstock G, Ford AP (2006) Pharmacology of P2X channels. *Pflugers Arch* 452: 513-537
- Gielen M (2010) [Molecular operation of ionotropic glutamate receptors: proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission]. *Med Sci (Paris)* 26: 65-72
- Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, Paoletti P (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* 57: 80-93
- Gielen M, Sieglér Retchless B, Mony L, Johnson JW, Paoletti P (2009) Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature* 459: 703-707
- Giffard RG, Monyer H, Choi DW (1990) Selective vulnerability of cultured cortical glia to injury by extracellular acidosis. *Brain Res* 530: 138-141

- Gill A, Birdsey-Benson A, Jones BL, Henderson LP, Madden DR (2008) Correlating AMPA receptor activation and cleft closure across subunits: crystal structures of the GluR4 ligand-binding domain in complex with full and partial agonists. *Biochemistry* 47: 13831-13841
- Glusker JP (1991) Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins. *Adv Protein Chem* 42: 1-76
- Goldberg JH, Yuste R, Tamas G (2003) Ca²⁺ imaging of mouse neocortical interneurone dendrites: contribution of Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptors to subthreshold Ca²⁺-dynamics. *J Physiol* 551: 67-78
- Green WN, Claudio T (1993) Acetylcholine receptor assembly: subunit folding and oligomerization occur sequentially. *Cell* 74: 57-69
- Greger IH, Akamine P, Khatri L, Ziff EB (2006) Developmentally regulated, combinatorial RNA processing modulates AMPA receptor biogenesis. *Neuron* 51: 85-97
- Greger IH, Esteban JA (2007) AMPA receptor biogenesis and trafficking. *Curr Opin Neurobiol* 17: 289-297
- Greger IH, Khatri L, Kong X, Ziff EB (2003) AMPA receptor tetramerization is mediated by Q/R editing. *Neuron* 40: 763-774
- Greger IH, Ziff EB, Penn AC (2007) Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends Neurosci* 30: 407-416
- Greiss S, Chin JW (2011) Expanding the genetic code of an animal. *J Am Chem Soc* 133: 14196-14199
- Grigorenko EV, Bell WL, Glazier S, Pons T, Deadwyler S (1998) Editing status at the Q/R site of the GluR2 and GluR6 glutamate receptor subunits in the surgically excised hippocampus of patients with refractory epilepsy. *Neuroreport* 9: 2219-2224
- Groc L, Heine M, Cognet L, Brickley K, Stephenson FA, Lounis B, Choquet D (2004) Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of AMPA and NMDA receptors. *Nat Neurosci* 7: 695-696
- Groc L, Heine M, Cousins SL, Stephenson FA, Lounis B, Cognet L, Choquet D (2006) NMDA receptor surface mobility depends on NR2A-2B subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 18769-18774
- Groff D, Chen PR, Peters FB, Schultz PG (2010) A genetically encoded epsilon-N-methyl lysine in mammalian cells. *Chembiochem* 11: 1066-1068
- Grunbeck A, Huber T, Sachdev P, Sakmar TP (2011) Mapping the ligand-binding site on a G protein-coupled receptor (GPCR) using genetically encoded photocrosslinkers. *Biochemistry* 50: 3411-3413
- Haeger S, Kuzmin D, Detro-Dassen S, Lang N, Kilb M, Tsetlin V, Betz H, Laube B, Schmalzing G (2010) An intramembrane aromatic network determines pentameric assembly of Cys-loop receptors. *Nat Struct Mol Biol* 17: 90-98
- Hall RA, Kessler M, Quan A, Ambros-Ingerson J, Lynch G (1993) Cyclothiazide decreases [3H]AMPA binding to rat brain membranes: evidence that AMPA receptor desensitization increases agonist affinity. *Brain Res* 628: 345-348
- Hallett PJ, Brotchie JM (2007) Striatal delta opioid receptor binding in experimental models of Parkinson's disease and dyskinesia. *Mov Disord* 22: 28-40
- Hallett PJ, Dunah AW, Ravenscroft P, Zhou S, Bezard E, Crossman AR, Brotchie JM, Standaert DG (2005) Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 48: 503-516
- Hamill OP (2006) Twenty odd years of stretch-sensitive channels. *Pflugers Arch* 453: 333-351

- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100
- Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Full C, Fukiwake T, Terui Y, Leewanich P, Nishimura K, Toida T, Williams K, Kashiwagi K, Igarashi K (2008) Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Neurochem* 107: 1566-1577
- Hancock SM, Uprety R, Deiters A, Chin JW (2010) Expanding the genetic code of yeast for incorporation of diverse unnatural amino acids via a pyrrolysyl-tRNA synthetase/tRNA pair. *J Am Chem Soc* 132: 14819-14824
- Hancock WS, Wu SL, Stanley RR, Gombocz EA (2002) Publishing large proteome datasets: scientific policy meets emerging technologies. *Trends Biotechnol* 20: S39-44
- Hanek AP, Lester HA, Dougherty DA (2010) Photochemical proteolysis of an unstructured linker of the GABAAR extracellular domain prevents GABA but not pentobarbital activation. *Mol Pharmacol* 78: 29-35
- Hansen KB, Furukawa H, Traynelis SF (2010) Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain. *Mol Pharmacol* 78: 535-549
- Hansen KB, Naur P, Kurtkaya NL, Kristensen AS, Gajhede M, Kastrup JS, Traynelis SF (2009) Modulation of the dimer interface at ionotropic glutamate-like receptor delta2 by D-serine and extracellular calcium. *J Neurosci* 29: 907-917
- Hansen KB, Tajima N, Risgaard R, Perszyk RE, Jorgensen L, Vance KM, Ogden KK, Clausen RP, Furukawa H, Traynelis SF (2013) Structural determinants of agonist efficacy at the glutamate binding site of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 84: 114-127
- Hansen KB, Traynelis SF (2011) How glutamate receptor subunits mix and match: details uncovered. *Neuron* 71: 198-200
- Hansen KB, Yuan H, Traynelis SF (2007) Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. *Curr Opin Neurobiol* 17: 281-288
- Harding HP, Novoa I, Bertolotti A, Zeng H, Zhang Y, Urano F, Jousse C, Ron D (2001) Translational regulation in the cellular response to biosynthetic load on the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66: 499-508
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci* 5: 405-414
- Harris AZ, Pettit DL (2007) Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol* 584: 509-519
- Hatton CJ, Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* 46: 261-274
- Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485: 207-212
- Heckler TG, Chang LH, Zama Y, Naka T, Chorghade MS, Hecht SM (1984) T4 RNA ligase mediated preparation of novel "chemically misacylated" tRNA^{Phe}S. *Biochemistry* 23: 1468-1473
- Heine M, Groc L, Frischknecht R, Beique JC, Lounis B, Rumbaugh G, Haganir RL, Cognet L, Choquet D (2008) Surface mobility of postsynaptic AMPARs tunes synaptic transmission. *Science* 320: 201-205
- Henley JM, Barker EA, Glebov OO (2011) Routes, destinations and delays: recent advances in AMPA receptor trafficking. *Trends Neurosci* 34: 258-268

- Henson MA, Roberts AC, Perez-Otano I, Philpot BD (2010) Influence of the NR3A subunit on NMDA receptor functions. *Prog Neurobiol* 91: 23-37
- Herguedas B, Krieger J, Greger IH (2013) Receptor heteromeric assembly-how it works and why it matters: the case of ionotropic glutamate receptors. *Prog Mol Biol Transl Sci* 117: 361-386
- Hilf RJ, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452: 375-379
- Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. Sinauer, Sunderland, Mass.
- Hino N, Oyama M, Sato A, Mukai T, Iraha F, Hayashi A, Kozuka-Hata H, Yamamoto T, Yokoyama S, Sakamoto K (2011) Genetic incorporation of a photo-crosslinkable amino acid reveals novel protein complexes with GRB2 in mammalian cells. *J Mol Biol* 406: 343-353
- Hodgkin AL, Huxley AF (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol* 117: 500-544
- Hollmann M, Boulter J, Maron C, Beasley L, Sullivan J, Pecht G, Heinemann S (1993) Zinc potentiates agonist-induced currents at certain splice variants of the NMDA receptor. *Neuron* 10: 943-954
- Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252: 851-853
- Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S (1989) Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature* 342: 643-648
- Holm RH, Kennepohl P, Solomon EI (1996) Structural and Functional Aspects of Metal Sites in Biology. *Chem Rev* 96: 2239-2314
- Horak M, Wenthold RJ (2009) Different roles of C-terminal cassettes in the trafficking of full-length NR1 subunits to the cell surface. *J Biol Chem* 284: 9683-9691
- Horne AJ, Fedida D (2009) Use of voltage clamp fluorimetry in understanding potassium channel gating: a review of Shaker fluorescence data. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 411-418
- Horning MS, Mayer ML (2004) Regulation of AMPA receptor gating by ligand binding core dimers. *Neuron* 41: 379-388
- Hou Y, Wang J, Andreana PR, Cantauria G, Tarasia S, Sharp L, Braunschweiger PG, Wang PG (1999) Targeting nitric oxide to cancer cells: cytotoxicity studies of glyco-S-nitrosothiols. *Bioorg Med Chem Lett* 9: 2255-2258
- Houamed KM, Kuijper JL, Gilbert TL, Haldeman BA, O'Hara PJ, Mulvihill ER, Almers W, Hagen FS (1991) Cloning, expression, and gene structure of a G protein-coupled glutamate receptor from rat brain. *Science* 252: 1318-1321
- Hu H, Sachs F (1997) Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1511-1523
- Huber T, Naganathan S, Tian H, Ye S, Sakmar TP (2013) Unnatural amino acid mutagenesis of GPCRs using amber codon suppression and bioorthogonal labeling. *Methods Enzymol* 520: 281-305
- Huh KH, Wenthold RJ (1999) Turnover analysis of glutamate receptors identifies a rapidly degraded pool of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit, NR1, in cultured cerebellar granule cells. *J Biol Chem* 274: 151-157
- Hume RI, Dingledine R, Heinemann SF (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability. *Science* 253: 1028-1031

- Inanobe A, Furukawa H, Gouaux E (2005) Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. *Neuron* 47: 71-84
- Isaac JT, Ashby MC, McBain CJ (2007) The role of the GluR2 subunit in AMPA receptor function and synaptic plasticity. *Neuron* 54: 859-871
- Iversen L, Mulvihill E, Haldeman B, Diemer NH, Kaiser F, Sheardown M, Kristensen P (1994) Changes in metabotropic glutamate receptor mRNA levels following global ischemia: increase of a putative presynaptic subtype (mGluR4) in highly vulnerable rat brain areas. *J Neurochem* 63: 625-633
- Jahr CE, Stevens CF (1987) Glutamate activates multiple single channel conductances in hippocampal neurons. *Nature* 325: 522-525
- Jane DE, Lodge D, Collingridge GL (2009) Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potential. *Neuropharmacology* 56: 90-113
- Jarvis MF, Khakh BS (2009) ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56: 208-215
- Jaskolski F, Coussen F, Mulle C (2005) Subcellular localization and trafficking of kainate receptors. *Trends Pharmacol Sci* 26: 20-26
- Javitch JA (1998) Probing structure of neurotransmitter transporters by substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol* 296: 331-346
- Javitch JA, Li X, Kaback J, Karlin A (1994) A cysteine residue in the third membrane-spanning segment of the human D2 dopamine receptor is exposed in the binding-site crevice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10355-10359
- Jiang R, Lemoine D, Martz A, Taly A, Gonin S, Prado de Carvalho L, Specht A, Grutter T (2011) Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 9066-9071
- Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T (2012) Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J* 31: 2134-2143
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Ruta V, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R (2003) X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel. *Nature* 423: 33-41
- Jin R, Banke TG, Mayer ML, Traynelis SF, Gouaux E (2003) Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 6: 803-810
- Jin R, Singh SK, Gu S, Furukawa H, Sobolevsky AI, Zhou J, Jin Y, Gouaux E (2009) Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *EMBO J* 28: 1812-1823
- Johnson JW, Ascher P (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325: 529-531
- Kakegawa W, Miyoshi Y, Hamase K, Matsuda S, Matsuda K, Kohda K, Emi K, Motohashi J, Konno R, Zaitsev K, Yuzaki M (2011) D-serine regulates cerebellar LTD and motor coordination through the delta2 glutamate receptor. *Nat Neurosci* 14: 603-611
- Kalstrup T, Blunck R (2013) Dynamics of internal pore opening in K(V) channels probed by a fluorescent unnatural amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 8272-8277
- Kamboj SK, Swanson GT, Cull-Candy SG (1995) Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors. *J Physiol* 486 (Pt 2): 297-303
- Kang JY, Kawaguchi D, Coin I, Xiang Z, O'Leary DD, Slesinger PA, Wang L (2013) In Vivo expression of a light-activatable potassium channel using unnatural amino acids. *Neuron* 80: 358-370

- Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2009) Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *EMBO J* 28: 3910-3920
- Karakas E, Simorowski N, Furukawa H (2011) Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors. *Nature* 475: 249-253
- Karlin A, Akabas MH (1998) Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol* 293: 123-145
- Karlin A, Akabas MH, Czajkowski C, Kaufmann C, Stauffer D, Xu M (1994) Structures involved in binding, gating, and conduction in nicotinic acetylcholine receptors. *Renal physiology and biochemistry* 17: 184-186
- Kashiwabuchi N, Ikeda K, Araki K, Hirano T, Shibuki K, Takayama C, Inoue Y, Kutsuwada T, Yagi T, Kang Y, et al. (1995) Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR delta 2 mutant mice. *Cell* 81: 245-252
- Katz B (1966) *Nerve, muscle, and synapse*. McGraw-Hill, New York,
- Katz B (1996) Neural transmitter release: from quantal secretion to exocytosis and beyond. The Fenn Lecture. *J Neurocytol* 25: 677-686
- Katz B, Thesleff S (1957) A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138: 63-80
- Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460: 592-598
- Kazi R, Gan Q, Talukder I, Markowitz M, Salussolia CL, Wollmuth LP (2013) Asynchronous movements prior to pore opening in NMDA receptors. *J Neurosci* 33: 12052-12066
- Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 5 Suppl: 1039-1042
- Kew JN, Kemp JA (1998) An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* 512 (Pt 1): 17-28
- Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2: 322-330
- Kiick KL, Saxon E, Tirrell DA, Bertozzi CR (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 19-24
- Klausberger T, Ehya N, Fuchs K, Fuchs T, Ebert V, Sarto I, Sieghart W (2001) Detection and binding properties of GABA(A) receptor assembly intermediates. *J Biol Chem* 276: 16024-16032
- Kleckner NW, Dingledine R (1988) Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 241: 835-837
- Kleckner NW, Dingledine R (1991) Regulation of hippocampal NMDA receptors by magnesium and glycine during development. *Brain Res Mol Brain Res* 11: 151-159
- Kohda K, Wang Y, Yuzaki M (2000) Mutation of a glutamate receptor motif reveals its role in gating and delta2 receptor channel properties. *Nat Neurosci* 3: 315-322
- Kohler M, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1993) Determinants of Ca²⁺ permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate receptor channels: diversity by RNA editing. *Neuron* 10: 491-500
- Kohler M, Kornau HC, Seeburg PH (1994) The organization of the gene for the functionally dominant alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor subunit GluR-B. *J Biol Chem* 269: 17367-17370

- Kohr G (2006) NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* 326: 439-446
- Kohr G, Eckardt S, Luddens H, Monyer H, Seeburg PH (1994) NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 12: 1031-1040
- Kohrer C, Xie L, Kellerer S, Varshney U, RajBhandary UL (2001) Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: a general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14310-14315
- Kramer RH, Fortin DL, Trauner D (2009) New photochemical tools for controlling neuronal activity. *Curr Opin Neurobiol* 19: 544-552
- Kreienkamp HJ, Maeda RK, Sine SM, Taylor P (1995) Intersubunit contacts governing assembly of the mammalian nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 14: 635-644
- Krovetz HS, VanDongen HM, VanDongen AM (1997) Atomic distance estimates from disulfides and high-affinity metal-binding sites in a K⁺ channel pore. *Biophys J* 72: 117-126
- Kumar J, Mayer ML (2010) Crystal structures of the glutamate receptor ion channel GluK3 and GluK5 amino-terminal domains. *J Mol Biol* 404: 680-696
- Kumar J, Mayer ML (2013) Functional insights from glutamate receptor ion channel structures. *Annu Rev Physiol* 75: 313-337
- Kumar J, Schuck P, Jin R, Mayer ML (2009) The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nat Struct Mol Biol* 16: 631-638
- Kumar J, Schuck P, Mayer ML (2011) Structure and assembly mechanism for heteromeric kainate receptors. *Neuron* 71: 319-331
- Kuner T, Schoepfer R (1996) Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels. *J Neurosci* 16: 3549-3558
- Kuner T, Seeburg PH, Guy HR (2003) A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors? *Trends Neurosci* 26: 27-32
- Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* 407: 971-977
- Kuryatov A, Laube B, Betz H, Kuhse J (1994) Mutational analysis of the glycine-binding site of the NMDA receptor: structural similarity with bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 12: 1291-1300
- Kurz LL, Zuhlke RD, Zhang HJ, Joho RH (1995) Side-chain accessibilities in the pore of a K⁺ channel probed by sulfhydryl-specific reagents after cysteine-scanning mutagenesis. *Biophys J* 68: 900-905
- Kussius CL, Kaur N, Popescu GK (2009) Pregnanolone sulfate promotes desensitization of activated NMDA receptors. *J Neurosci* 29: 6819-6827
- Kussius CL, Popescu AM, Popescu GK (2010) Agonist-specific gating of NMDA receptors. *Channels* 4: 78-82
- Kussius CL, Popescu GK (2009) Kinetic basis of partial agonism at NMDA receptors. *Nat Neurosci* 12: 1114-1120
- Kuusinen A, Abele R, Madden DR, Keinanen K (1999) Oligomerization and ligand-binding properties of the ectodomain of the alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunit GluRD. *J Biol Chem* 274: 28937-28943

- Lakowicz, JR (1999). Energy transfer. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd ed. Plenum, New York. 367–394.
- Lambolez B, Audinat E, Bochet P, Crepel F, Rossier J (1992) AMPA receptor subunits expressed by single Purkinje cells. *Neuron* 9: 247-258
- Landes CF, Rambhadran A, Taylor JN, Salatan F, Jayaraman V (2011) Structural landscape of isolated agonist-binding domains from single AMPA receptors. *Nat Chem Biol* 7: 168-173
- Lau AY, Roux B (2011) The hidden energetics of ligand binding and activation in a glutamate receptor. *Nat Struct Mol Biol* 18: 283-287
- Lau AY, Salazar H, Blachowicz L, Ghisi V, Plested AJ, Roux B (2013) A conformational intermediate in glutamate receptor activation. *Neuron* 79: 492-503
- Lau CG, Zukin RS (2007) NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nat Rev Neurosci* 8: 413-426
- Laube B, Hirai H, Sturgess M, Betz H, Kuhse J (1997) Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit. *Neuron* 18: 493-503
- Laurie DJ, Seeburg PH (1994) Regional and developmental heterogeneity in splicing of the rat brain NMDAR1 mRNA. *J Neurosci* 14: 3180-3194
- Lee CJ, Bardoni R, Tong CK, Engelman HS, Joseph DJ, Magherini PC, MacDermott AB (2002) Functional expression of AMPA receptors on central terminals of rat dorsal root ganglion neurons and presynaptic inhibition of glutamate release. *Neuron* 35: 135-146
- Lee CH, Gouaux E (2011) Amino terminal domains of the NMDA receptor are organized as local heterodimers. *PLoS One* 6: e19180
- Lee HS, Guo J, Lemke EA, Dimla RD, Schultz PG (2009) Genetic incorporation of a small, environmentally sensitive, fluorescent probe into proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Chem Soc* 131: 12921-12923
- Legendre P, Rosenmund C, Westbrook GL (1993) Inactivation of NMDA channels in cultured hippocampal neurons by intracellular calcium. *J Neurosci* 13: 674-684
- Legendre P, Westbrook GL (1990) The inhibition of single N-methyl-D-aspartate-activated channels by zinc ions on cultured rat neurones. *J Physiol* 429: 429-449
- Lemke EA, Summerer D, Geierstanger BH, Brittain SM, Schultz PG (2007) Control of protein phosphorylation with a genetically encoded photocaged amino acid. *Nat Chem Biol* 3: 769-772
- Lemoine D, Jiang R, Taly A, Chataigneau T, Specht A, Grutter T (2012) Ligand-Gated Ion Channels: New Insights into Neurological Disorders and Ligand Recognition. *Chem Rev*
- Lester RA, Clements JD, Westbrook GL, Jahr CE (1990) Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature* 346: 565-567
- Leuschner WD, Hoch W (1999) Subtype-specific assembly of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid receptor subunits is mediated by their n-terminal domains. *J Biol Chem* 274: 16907-16916
- Lewis DA, Lieberman JA (2000) Catching up on schizophrenia: natural history and neurobiology. *Neuron* 28: 325-334
- Li M, Kawate T, Silberberg SD, Swartz KJ (2010) Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. *Nat Commun* 1: 44
- Li X, Fekner T, Ottesen JJ, Chan MK (2009) A pyrrolysine analogue for site-specific protein ubiquitination. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 9184-9187

- Liman ER, Tytgat J, Hess P (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9: 861-871
- Lipton SA (1999) Redox sensitivity of NMDA receptors. *Methods in molecular biology* 128: 121-130
- Liu CC, Schultz PG (2006) Recombinant expression of selectively sulfated proteins in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 24: 1436-1440
- Liu CC, Schultz PG (2010) Adding new chemistries to the genetic code. *Annu Rev Biochem* 79: 413-444
- Liu DR, Magliery TJ, Pastrnak M, Schultz PG (1997) Engineering a tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase for the site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 10092-10097
- Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM, Wang YT (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27: 2846-2857
- Lomeli H, Mosbacher J, Melcher T, Hoyer T, Geiger JR, Kuner T, Monyer H, Higuchi M, Bach A, Seeburg PH (1994) Control of kinetic properties of AMPA receptor channels by nuclear RNA editing. *Science* 266: 1709-1713
- Lomeli H, Sprengel R, Laurie DJ, Kohr G, Herb A, Seeburg PH, Wisden W (1993) The rat delta-1 and delta-2 subunits extend the excitatory amino acid receptor family. *FEBS Lett* 315: 318-322
- Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309: 897-903
- Low CM, Lyuboslavsky P, French A, Le P, Wyatte K, Thiel WH, Marchan EM, Igarashi K, Kashiwagi K, Gernert K, Williams K, Traynelis SF, Zheng F (2003) Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol* 63: 1212-1222
- Low CM, Wee KS (2010) New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function. *Mol Pharmacol* 78: 1-11
- Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 11062-11067
- Lu W, Shi Y, Jackson AC, Bjorgan K, During MJ, Sprengel R, Seeburg PH, Nicoll RA (2009) Subunit composition of synaptic AMPA receptors revealed by a single-cell genetic approach. *Neuron* 62: 254-268
- Lynch JW (2009) Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology* 56: 303-309
- Mann M, Jensen ON (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21: 255-261
- Mannuzzu LM, Moronne MM, Isacoff EY (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science* 271: 213-216
- Mansour M, Nagarajan N, Nehring RB, Clements JD, Rosenmund C (2001) Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement. *Neuron* 32: 841-853
- Martin AB, Schultz PG (1999) Opportunities at the interface of chemistry and biology. *Trends in cell biology* 9: M24-28
- Masu M, Tanabe Y, Tsuchida K, Shigemoto R, Nakanishi S (1991) Sequence and expression of a metabotropic glutamate receptor. *Nature* 349: 760-765

- Masugi-Tokita M, Tarusawa E, Watanabe M, Molnar E, Fujimoto K, Shigemoto R (2007) Number and density of AMPA receptors in individual synapses in the rat cerebellum as revealed by SDS-digested freeze-fracture replica labeling. *J Neurosci* 27: 2135-2144
- Masuko T, Kashiwagi K, Kuno T, Nguyen ND, Pahk AJ, Fukuchi J, Igarashi K, Williams K (1999) A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor: effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* 55: 957-969
- Matsubara A, Laake JH, Davanger S, Usami S, Ottersen OP (1996) Organization of AMPA receptor subunits at a glutamate synapse: a quantitative immunogold analysis of hair cell synapses in the rat organ of Corti. *J Neurosci* 16: 4457-4467
- Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res* 100: 43-52
- Matsuda K, Miura E, Miyazaki T, Kakegawa W, Emi K, Narumi S, Fukazawa Y, Ito-Ishida A, Kondo T, Shigemoto R, Watanabe M, Yuzaki M (2010) Cbln1 is a ligand for an orphan glutamate receptor delta2, a bidirectional synapse organizer. *Science* 328: 363-368
- Matsuda S, Kamiya Y, Yuzaki M (2005) Roles of the N-terminal domain on the function and quaternary structure of the ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 280: 20021-20029
- Matsui T, Sekiguchi M, Hashimoto A, Tomita U, Nishikawa T, Wada K (1995) Functional comparison of D-serine and glycine in rodents: the effect on cloned NMDA receptors and the extracellular concentration. *J Neurochem* 65: 454-458
- Mayer M (2004) Structure and function of glutamate receptors. *Ann N Y Acad Sci* 1038: 125-130
- Mayer ML (2005) Glutamate receptor ion channels. *Curr Opin Neurobiol* 15: 282-288
- Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* 440: 456-462
- Mayer ML (2011a) Emerging models of glutamate receptor ion channel structure and function. *Structure* 19: 1370-1380
- Mayer ML (2011b) Structure and mechanism of glutamate receptor ion channel assembly, activation and modulation. *Curr Opin Neurobiol* 21: 283-290
- Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Clements J (1989) Regulation of NMDA receptor desensitization in mouse hippocampal neurons by glycine. *Nature* 338: 425-427
- Mayer ML, Vyklicky L, Jr., Westbrook GL (1989) Modulation of excitatory amino acid receptors by group IIB metal cations in cultured mouse hippocampal neurones. *J Physiol* 415: 329-350
- Mayer ML, Westbrook GL (1987) Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol* 394: 501-527
- McCormack K, Lin L, Iverson LE, Tanouye MA, Sigworth FJ (1992) Tandem linkage of Shaker K⁺ channel subunits does not ensure the stoichiometry of expressed channels. *Biophys J* 63: 1406-1411
- McIlhinney RA, Le Bourdelles B, Molnar E, Tricaud N, Streit P, Whiting PJ (1998) Assembly intracellular targeting and cell surface expression of the human N-methyl-D-aspartate receptor subunits NR1a and NR2A in transfected cells. *Neuropharmacology* 37: 1355-1367
- Meddows E, Le Bourdelles B, Grimwood S, Wafford K, Sandhu S, Whiting P, McIlhinney RA (2001) Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem* 276: 18795-18803

- Millar NS, Gotti C (2009) Diversity of vertebrate nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropharmacology* 56: 237-246
- Miller JC, Silverman SK, England PM, Dougherty DA, Lester HA (1998) Flash decaging of tyrosine sidechains in an ion channel. *Neuron* 20: 619-624
- Miller PS, Smart TG (2010) Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends Pharmacol Sci* 31: 161-174
- Minakami R, Katsuki F, Yamamoto T, Nakamura K, Sugiyama H (1994) Molecular cloning and the functional expression of two isoforms of human metabotropic glutamate receptor subtype 5. *Biochem Biophys Res Commun* 199: 1136-1143
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N (2003) Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423: 949-955
- Moghaddam B, Javitt D (2012) From revolution to evolution: the glutamate hypothesis of schizophrenia and its implication for treatment. *Neuropsychopharmacology* 37: 4-15
- Mohn AR, Gainetdinov RR, Caron MG, Koller BH (1999) Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell* 98: 427-436
- Mony L, Kew JN, Gunthorpe MJ, Paoletti P (2009) Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol* 157: 1301-1317
- Mony L, Zhu S, Carvalho S, Paoletti P (2011) Molecular basis of positive allosteric modulation of GluN2B NMDA receptors by polyamines. *EMBO J* 30: 3134-3146
- Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529-540
- Monyer H, Seeburg PH, Wisden W (1991) Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. *Neuron* 6: 799-810
- Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256: 1217-1221
- Moore BS, Mirshahi UL, Ebersole TL, Mirshahi T (2013) A conserved mechanism for gating in an ionotropic glutamate receptor. *J Biol Chem* 288: 18842-18852
- Mori H, Ito K (2006) Different modes of SecY-SecA interactions revealed by site-directed in vivo photo-cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16159-16164
- Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M (1992) Identification by mutagenesis of a Mg(2+)-block site of the NMDA receptor channel. *Nature* 358: 673-675
- Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology* 34: 1219-1237
- Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S (1991) Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354: 31-37
- Morris JL, Reddington SC, Murphy DM, Jones DD, Platts JA, Tippmann EM (2013) Aryl azide photochemistry in defined protein environments. *Organic letters* 15: 728-731
- Mosbacher J, Schoepfer R, Monyer H, Burnashev N, Seeburg PH, Ruppersberg JP (1994) A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science* 266: 1059-1062

- Moscato EH, Jain A, Peng X, Hughes EG, Dalmau J, Balice-Gordon RJ (2010) Mechanisms underlying autoimmune synaptic encephalitis leading to disorders of memory, behavior and cognition: insights from molecular, cellular and synaptic studies. *Eur J Neurosci* 32: 298-309
- Mosley CA, Acker TM, Hansen KB, Mullasseril P, Andersen KT, Le P, Vellano KM, Brauner-Osborne H, Liotta DC, Traynelis SF (2010) Quinazolin-4-one derivatives: A novel class of noncompetitive NR2C/D subunit-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists. *J Med Chem* 53: 5476-5490
- Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, Rogawski MA, Snyder SH (2000) D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4926-4931
- Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* 1: 659-667
- Mott DD, Rojas A, Fisher JL, Dingledine RJ, Benveniste M (2010) Subunit-specific desensitization of heteromeric kainate receptors. *J Physiol* 588: 683-700
- Mukai T, Wakiyama M, Sakamoto K, Yokoyama S (2010) Genetic encoding of non-natural amino acids in *Drosophila melanogaster* Schneider 2 cells. *Protein Sci* 19: 440-448
- Mulder J, Aguado T, Keimpema E, Barabas K, Ballester Rosado CJ, Nguyen L, Monory K, Marsicano G, Di Marzo V, Hurd YL, Guillemot F, Mackie K, Lutz B, Guzman M, Lu HC, Galve-Roperh I, Harkany T (2008) Endocannabinoid signaling controls pyramidal cell specification and long-range axon patterning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8760-8765
- Mullasseril P, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Yuan H, Kurtkaya NL, Santangelo R, Orr AG, Le P, Vellano KM, Liotta DC, Traynelis SF (2010) A subunit-selective potentiator of NR2C- and NR2D-containing NMDA receptors. *Nat Commun* 1: 1-8
- Mulle C, Sailer A, Perez-Otano I, Dickinson-Anson H, Castillo PE, Bureau I, Maron C, Gage FH, Mann JR, Bettler B, Heinemann SF (1998) Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature* 392: 601-605
- Nakagawa T (2010) The biochemistry, ultrastructure, and subunit assembly mechanism of AMPA receptors. *Mol Neurobiol* 42: 161-184
- Nakagawa T, Cheng Y, Ramm E, Sheng M, Walz T (2005) Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature* 433: 545-549
- Nakagawa T, Engler JA, Sheng M (2004) The dynamic turnover and functional roles of alpha-actinin in dendritic spines. *Neuropharmacology* 47: 734-745
- Naur P, Hansen KB, Kristensen AS, Dravid SM, Pickering DS, Olsen L, Vestergaard B, Egebjerg J, Gajhede M, Traynelis SF, Kastrop JS (2007) Ionotropic glutamate-like receptor delta2 binds D-serine and glycine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14116-14121
- Nayeem N, Mayans O, Green T (2011) Conformational flexibility of the ligand-binding domain dimer in kainate receptor gating and desensitization. *J Neurosci* 31: 2916-2924
- Nayeem N, Zhang Y, Schweppe DK, Madden DR, Green T (2009) A nondesensitizing kainate receptor point mutant. *Mol Pharmacol* 76: 534-542
- Neher E, Sakmann B (1976) Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260: 799-802
- Neumann H, Hazen JL, Weinstein J, Mehl RA, Chin JW (2008) Genetically encoding protein oxidative damage. *J Am Chem Soc* 130: 4028-4033
- Neumann H, Wang K, Davis L, Garcia-Alai M, Chin JW (2010) Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome. *Nature* 464: 441-444

- Ng FM, Geballe MT, Snyder JP, Traynelis SF, Low CM (2008) Structural insights into phenylethanolamines high-affinity binding site in NR2B from binding and molecular modeling studies. *Mol Brain* 1: 16
- Nguyen DP, Garcia Alai MM, Virdee S, Chin JW (2010) Genetically directing varepsilon-N, N-dimethyl-L-lysine in recombinant histones. *Chem Biol* 17: 1072-1076
- Nicoll RA, Tomita S, Brecht DS (2006) Auxiliary subunits assist AMPA-type glutamate receptors. *Science* 311: 1253-1256
- Niehusmann P, Dalmau J, Rudlowski C, Vincent A, Elger CE, Rossi JE, Bien CG (2009) Diagnostic value of N-methyl-D-aspartate receptor antibodies in women with new-onset epilepsy. *Arch Neurol* 66: 458-464
- Nikam SS, Meltzer LT (2002) NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Curr Pharm Des* 8: 845-855
- Nilsson A, Eriksson M, Muly EC, Akesson E, Samuelsson EB, Bogdanovic N, Benedikz E, Sundstrom E (2007) Analysis of NR3A receptor subunits in human native NMDA receptors. *Brain Res* 1186: 102-112
- Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci* 21: RC185
- Niswender CM, Conn PJ (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 295-322
- Noda M, Furutani Y, Takahashi H, Toyosato M, Tanabe T, Shimizu S, Kikyotani S, Kayano T, Hirose T, Inayama S, et al. (1983) Cloning and sequence analysis of calf cDNA and human genomic DNA encoding alpha-subunit precursor of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 305: 818-823
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minamino N, et al. (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-127
- Noren CJ, Anthony-Cahill SJ, Griffith MC, Schultz PG (1989) A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science* 244: 182-188
- North RA (2002) Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 82: 1013-1067
- Nowak MW, Kearney PC, Sampson JR, Saks ME, Labarca CG, Silverman SK, Zhong W, Thorson J, Abelson JN, Davidson N, et al. (1995) Nicotinic receptor binding site probed with unnatural amino acid incorporation in intact cells. *Science* 268: 439-442
- Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, Ouagazzal AM, Le Goff A, Carvalho S, Reiss D, Gaveriaux-Ruff C, Neyton J, Paoletti P, Kieffer BL (2011) Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat Neurosci*, pp 1017-1022
- Nusser Z, Lujan R, Laube G, Roberts JD, Molnar E, Somogyi P (1998) Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron* 21: 545-559
- Nys M, Kesters D, Ulens C (2013) Structural insights into Cys-loop receptor function and ligand recognition. *Biochem Pharmacol* 86: 1042-1053
- O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V, Houamed KM, Thomsen C, Gilbert TL, Mulvihill ER (1993) The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding proteins. *Neuron* 11: 41-52
- Ohashi H, Maruyama T, Higashi-Matsumoto H, Nomoto T, Nishimura S, Takeuchi Y (2002) A novel binding assay for metabotropic glutamate receptors using [³H] L-quisqualic acid and recombinant receptors. *Z Naturforsch C* 57: 348-355

- Okabe S, Miwa A, Okado H (1999) Alternative splicing of the C-terminal domain regulates cell surface expression of the NMDA receptor NR1 subunit. *J Neurosci* 19: 7781-7792
- Olsen RW, Sieghart W (2009) GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology* 56: 141-148
- Panatier A, Theodosis DT, Mothet JP, Touquet B, Pollegioni L, Poulain DA, Oliet SH (2006) Glia-derived D-serine controls NMDA receptor activity and synaptic memory. *Cell* 125: 775-784
- Paoletti P (2011) Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33: 1351-1365
- Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* 17: 5711-5725
- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 383-400
- Paoletti P, Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* 7: 39-47
- Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding n-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* 28: 911-925
- Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009) Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* 158: 126-136
- Papadakis M, Hawkins LM, Stephenson FA (2004) Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *J Biol Chem* 279: 14703-14712
- Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, Groc L, Pollegioni L, Mothet JP, Oliet SH (2012) Synaptic and Extrasynaptic NMDA Receptors Are Gated by Different Endogenous Coagonists. *Cell* 150: 633-646
- Park HS, Hohn MJ, Umehara T, Guo LT, Osborne EM, Benner J, Noren CJ, Rinehart J, Soll D (2011) Expanding the genetic code of *Escherichia coli* with phosphoserine. *Science* 333: 1151-1154
- Parrish AR, She X, Xiang Z, Coin I, Shen Z, Briggs SP, Dillin A, Wang L (2012) Expanding the genetic code of *Caenorhabditis elegans* using bacterial aminoacyl-tRNA synthetase/tRNA pairs. *ACS Chem Biol* 7: 1292-1302
- Paschen W, Widmann R, Weber C (1992) Changes in regional polyamine profiles in rat brains after transient cerebral ischemia (single versus repetitive ischemia): evidence for release of polyamines from injured neurons. *Neurosci Lett* 135: 121-124
- Patneau DK, Wright PW, Winters C, Mayer ML, Gallo V (1994) Glial cells of the oligodendrocyte lineage express both kainate- and AMPA-preferring subtypes of glutamate receptor. *Neuron* 12: 357-371
- Penn AC, Greger IH (2009) Sculpting AMPA receptor formation and function by alternative RNA processing. *RNA Biol* 6: 517-521
- Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* 22: 5955-5965
- Perrais D, Pinheiro PS, Jane DE, Mulle C (2009) Antagonism of recombinant and native GluK3-containing kainate receptors. *Neuropharmacology* 56: 131-140
- Perry LJ, Wetzel R (1984) Disulfide bond engineered into T4 lysozyme: stabilization of the protein toward thermal inactivation. *Science* 226: 555-557

- Petersson EJ, Brandt GS, Zacharias NM, Dougherty DA, Lester HA (2003) Caging proteins through unnatural amino acid mutagenesis. *Methods Enzymol* 360: 258-273
- Petralia RS, Wang YX, Hua F, Yi Z, Zhou A, Ge L, Stephenson FA, Wenthold RJ (2010) Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167: 68-87
- Philipson KD, Gallivan JP, Brandt GS, Dougherty DA, Lester HA (2001) Incorporation of caged cysteine and caged tyrosine into a transmembrane segment of the nicotinic ACh receptor. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C195-206
- Pin JP, Galvez T, Prezeau L (2003) Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 98: 325-354
- Pin JP, Waeber C, Prezeau L, Bockaert J, Heinemann SF (1992) Alternative splicing generates metabotropic glutamate receptors inducing different patterns of calcium release in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10331-10335
- Pina-Crespo JC, Talantova M, Micu I, States B, Chen HS, Tu S, Nakanishi N, Tong G, Zhang D, Heinemann SF, Zamponi GW, Stys PK, Lipton SA (2010) Excitatory glycine responses of CNS myelin mediated by NR1/NR3 "NMDA" receptor subunits. *J Neurosci* 30: 11501-11505
- Pinheiro PS, Mulle C (2008) Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* 9: 423-436
- Pitt D, Gonzales E, Cross AH, Goldberg MP (2010) Dysmyelinated axons in shiverer mice are highly vulnerable to alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) receptor-mediated toxicity. *Brain Res* 1309: 146-154
- Plested AJ, Mayer ML (2007) Structure and mechanism of kainate receptor modulation by anions. *Neuron* 53: 829-841
- Plested AJ, Mayer ML (2009) AMPA receptor ligand binding domain mobility revealed by functional cross linking. *J Neurosci* 29: 11912-11923
- Plested AJ, Vijayan R, Biggin PC, Mayer ML (2008) Molecular basis of kainate receptor modulation by sodium. *Neuron* 58: 720-735
- Pohlsgaard J, Frydenvang K, Madsen U, Kastrup JS (2011) Lessons from more than 80 structures of the GluA2 ligand-binding domain in complex with agonists, antagonists and allosteric modulators. *Neuropharmacology* 60: 135-150
- Pollitt SK, Schultz PG (1998) A photochemical switch for controlling protein-protein interactions. *Angew Chem Int Edit* 37: 2104-2107
- Pongs O, Kecskemethy N, Muller R, Krah-Jentgens I, Baumann A, Kiltz HH, Canal I, Llamazares S, Ferrus A (1988) Shaker encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO J* 7: 1087-1096
- Poon K, Ahmed AH, Nowak LM, Oswald RE (2011) Mechanisms of modal activation of GluA3 receptors. *Mol Pharmacol* 80: 49-59
- Poon K, Nowak LM, Oswald RE (2010) Characterizing single-channel behavior of GluA3 receptors. *Biophys J* 99: 1437-1446
- Premkumar LS, Qin F, Auerbach A (1997) Subconductance states of a mutant NMDA receptor channel kinetics, calcium, and voltage dependence. *J Gen Physiol* 109: 181-189
- Prevost MS, Sauguet L, Nury H, Van Renterghem C, Huon C, Poitevin F, Baaden M, Delarue M, Corringer PJ (2012) A locally closed conformation of a bacterial pentameric proton-gated ion channel. *Nat Struct Mol Biol* 19: 642-649

- Priel A, Kollerker A, Ayalon G, Gillor M, Osten P, Stern-Bach Y (2005) Stargazin reduces desensitization and slows deactivation of the AMPA-type glutamate receptors. *J Neurosci* 25: 2682-2686
- Prieto ML, Wollmuth LP (2010) Gating modes in AMPA receptors. *J Neurosci* 30: 4449-4459
- Qian A, Buller AL, Johnson JW (2005) NR2 subunit-dependence of NMDA receptor channel block by external Mg²⁺. *J Physiol* 562: 319-331
- Qian A, Johnson JW (2006) Permeant ion effects on external Mg²⁺ block of NR1/2D NMDA receptors. *J Neurosci* 26: 10899-10910
- Qiu S, Hua YL, Yang F, Chen YZ, Luo JH (2005) Subunit assembly of N-methyl-D-aspartate receptors analyzed by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem* 280: 24923-24930
- Qu XX, Cai J, Li MJ, Chi YN, Liao FF, Liu FY, Wan Y, Han JS, Xing GG (2009) Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol* 215: 298-307
- Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* 25: 308-317
- Rambhadran A, Gonzalez J, Jayaraman V (2010) Subunit arrangement in N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *J Biol Chem* 285: 15296-15301
- Rambhadran A, Gonzalez J, Jayaraman V (2011) Conformational changes at the agonist binding domain of the N-methyl-D-aspartic acid receptor. *J Biol Chem* 286: 16953-16957
- Raymond V, Sattelle DB (2002) Novel animal-health drug targets from ligand-gated chloride channels. *Nat Rev Drug Discov* 1: 427-436
- Reddington SC, Rizkallah PJ, Watson PD, Pearson R, Tippmann EM, Jones DD (2013) Different photochemical events of a genetically encoded phenyl azide define and modulate GFP fluorescence. *Angew Chem Int Ed Engl* 52: 5974-5977
- Regalado MP, Villarroel A, Lerma J (2001) Intersubunit cooperativity in the NMDA receptor. *Neuron* 32: 1085-1096
- Renner C, Moroder L (2006) Azobenzene as conformational switch in model peptides. *Chembiochem* 7: 868-878
- Reynolds IJ, Miller RJ (1989) Ifenprodil is a novel type of N-methyl-D-aspartate receptor antagonist: interaction with polyamines. *Mol Pharmacol* 36: 758-765
- Rhee SS, Burke DH (2004) Tris(2-carboxyethyl)phosphine stabilization of RNA: comparison with dithiothreitol for use with nucleic acid and thiophosphoryl chemistry. *Anal Biochem* 325: 137-143
- Riou M, Stroebel D, Edwardson JM, Paoletti P (2012) An alternating GluN1-2-1-2 subunit arrangement in mature NMDA receptors. *PLoS One*, p e35134
- Roche KW, O'Brien RJ, Mammen AL, Bernhardt J, Haganir RL (1996) Characterization of multiple phosphorylation sites on the AMPA receptor GluR1 subunit. *Neuron* 16: 1179-1188
- Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 463-482
- Rodriguez-Moreno A, Sihra TS (2007) Metabotropic actions of kainate receptors in the CNS. *J Neurochem* 103: 2121-2135
- Rogers M, Dani JA (1995) Comparison of quantitative calcium flux through NMDA, ATP, and ACh receptor channels. *Biophys J* 68: 501-506

- Rondard P, Goudet C, Kniazeff J, Pin JP, Prezeau L (2011) The complexity of their activation mechanism opens new possibilities for the modulation of mGlu and GABAB class C G protein-coupled receptors. *Neuropharmacology* 60: 82-92
- Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science* 280: 1596-1599
- Rossmann M, Sukumaran M, Penn AC, Veprintsev DB, Babu MM, Greger IH (2011) Subunit-selective N-terminal domain associations organize the formation of AMPA receptor heteromers. *EMBO J* 30: 959-971
- Rozas JL, Paternain AV, Lerma J (2003) Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron* 39: 543-553
- Ruiz A, Sachidhanandam S, Utvik JK, Coussen F, Mulle C (2005) Distinct subunits in heteromeric kainate receptors mediate ionotropic and metabotropic function at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci* 25: 11710-11718
- Rumbaugh G, Prybylowski K, Wang JF, Vicini S (2000) Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *J Neurophysiol* 83: 1300-1306
- Ryu Y, Schultz PG (2006) Efficient incorporation of unnatural amino acids into proteins in *Escherichia coli*. *Nat Methods* 3: 263-265
- Safieddine S, Wenthold RJ (1997) The glutamate receptor subunit delta1 is highly expressed in hair cells of the auditory and vestibular systems. *J Neurosci* 17: 7523-7531
- Saito T (2006) In vivo electroporation in the embryonic mouse central nervous system. *Nature protocols* 1: 1552-1558
- Sakamoto K, Hayashi A, Sakamoto A, Kiga D, Nakayama H, Soma A, Kobayashi T, Kitabatake M, Takio K, Saito K, Shirouzu M, Hirao I, Yokoyama S (2002) Site-specific incorporation of an unnatural amino acid into proteins in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 30: 4692-4699
- Sakurada K, Masu M, Nakanishi S (1993) Alteration of Ca²⁺ permeability and sensitivity to Mg²⁺ and channel blockers by a single amino acid substitution in the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* 268: 410-415
- Salussolia CL, Prodromou ML, Borner P, Wollmuth LP (2011) Arrangement of Subunits in Functional NMDA Receptors. *J Neurosci* 31: 11295-11304
- Sandstead HH (2013) Human zinc deficiency: discovery to initial translation. *Adv Nutr* 4: 76-81
- Sato S, Mimasu S, Sato A, Hino N, Sakamoto K, Umehara T, Yokoyama S (2011) Crystallographic study of a site-specifically cross-linked protein complex with a genetically incorporated photoreactive amino acid. *Biochemistry* 50: 250-257
- Schauder DM, Kuybeda O, Zhang J, Klymko K, Bartsaghi A, Borgnia MJ, Mayer ML, Subramaniam S (2013) Glutamate receptor desensitization is mediated by changes in quaternary structure of the ligand binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 5921-5926
- Schell MJ (2004) The N-methyl D-aspartate receptor glycine site and D-serine metabolism: an evolutionary perspective. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 943-964
- Schenk U, Matteoli M (2004) Presynaptic AMPA receptors: more than just ion channels? *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 96: 257-260
- Schenk U, Verderio C, Benfenati F, Matteoli M (2003) Regulated delivery of AMPA receptor subunits to the presynaptic membrane. *EMBO J* 22: 558-568

- Schiffer HH, Swanson GT, Heinemann SF (1997) Rat GluR7 and a carboxy-terminal splice variant, GluR7b, are functional kainate receptor subunits with a low sensitivity to glutamate. *Neuron* 19: 1141-1146
- Schmid SM, Hollmann M (2008) To gate or not to gate: are the delta subunits in the glutamate receptor family functional ion channels? *Mol Neurobiol* 37: 126-141
- Schmid SM, Kott S, Sager C, Huelsken T, Hollmann M (2009) The glutamate receptor subunit delta2 is capable of gating its intrinsic ion channel as revealed by ligand binding domain transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 10320-10325
- Schmidt D, Jiang QX, MacKinnon R (2006) Phospholipids and the origin of cationic gating charges in voltage sensors. *Nature* 444: 775-779
- Schmitz D, Mellor J, Nicoll RA (2001) Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses. *Science* 291: 1972-1976
- Schneggenburger R (1996) Simultaneous measurement of Ca²⁺ influx and reversal potentials in recombinant N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* 70: 2165-2174
- Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci* 23: 1151-1158
- Schwenk J, Harmel N, Brechet A, Zolles G, Berkefeld H, Muller CS, Bildl W, Baehrens D, Huber B, Kulik A, Klocker N, Schulte U, Fakler B (2012) High-resolution proteomics unravel architecture and molecular diversity of native AMPA receptor complexes. *Neuron* 74: 621-633
- Seeburg PH (1996) The role of RNA editing in controlling glutamate receptor channel properties. *J Neurochem* 66: 1-5
- Seeburg PH, Higuchi M, Sprengel R (1998) RNA editing of brain glutamate receptor channels: mechanism and physiology. *Brain Res Brain Res Rev* 26: 217-229
- Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci* 10: 780-791
- Serwa R, Wilkening I, Del Signore G, Muhlberg M, Claussnitzer I, Weise C, Gerrits M, Hackenberger CP (2009) Chemoselective Staudinger-phosphite reaction of azides for the phosphorylation of proteins. *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 8234-8239
- Sgambato-Faure V, Cenci MA (2012) Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 96: 69-86
- Shanks NF, Maruo T, Farina AN, Ellisman MH, Nakagawa T (2010) Contribution of the global subunit structure and stargazin on the maturation of AMPA receptors. *J Neurosci* 30: 2728-2740
- Shen B, Xiang Z, Miller B, Louie G, Wang W, Noel JP, Gage FH, Wang L (2011) Genetically encoding unnatural amino acids in neural stem cells and optically reporting voltage-sensitive domain changes in differentiated neurons. *Stem Cells* 29: 1231-1240
- Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature* 368: 144-147
- Sheng M, Kim E (2011) The postsynaptic organization of synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Shepherd JD, Huganir RL (2007) The cell biology of synaptic plasticity: AMPA receptor trafficking. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 613-643
- Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Fielder TJ, Allen RJ, Fryer A, Yamashita S, O'Connell P, Wasmuth JJ (1995) Mutational analysis of familial and sporadic hyperekplexia. *Ann Neurol* 38: 85-91

- Sihra TS, Flores G, Rodriguez-Moreno A (2013) Kainate Receptors: Multiple Roles in Neuronal Plasticity. *Neuroscientist*
- Sine SM, Engel AG (2006) Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature* 440: 448-455
- Sirrieh RE, Maclean DM, Jayaraman V (2013) Amino-terminal domain tetramer organization and structural effects of zinc binding in the N-methyl D-Aspartate receptor. *J Biol Chem*
- Smart TG, Paoletti P (2012) Synaptic neurotransmitter-gated receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4
- Snyder EM, Nong Y, Almeida CG, Paul S, Moran T, Choi EY, Nairn AC, Salter MW, Lombroso PJ, Gouras GK, Greengard P (2005) Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid-beta. *Nat Neurosci* 8: 1051-1058
- Sobolevsky AI (2013) Structure and Gating of Tetrameric Glutamate Receptors. *J Physiol*
- Sobolevsky AI, Prodromou ML, Yelshansky MV, Wollmuth LP (2007) Subunit-specific contribution of pore-forming domains to NMDA receptor channel structure and gating. *J Gen Physiol* 129: 509-525
- Sobolevsky AI, Rosconi MP, Gouaux E (2009) X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature* 462: 745-756
- Sommer B, Burnashev N, Verdoorn TA, Keinänen K, Sakmann B, Seeburg PH (1992) A glutamate receptor channel with high affinity for domoate and kainate. *EMBO J* 11: 1651-1656
- Sommer B, Keinänen K, Verdoorn TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B, Seeburg PH (1990) Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS. *Science* 249: 1580-1585
- Stawski P, Janovjak H, Trauner D (2010) Pharmacology of ionotropic glutamate receptors: A structural perspective. *Bioorg Med Chem* 18: 7759-7772
- Steinlein O (1995) Detection of a CfoI polymorphism within exon 5 of the human neuronal nicotinic acetylcholine receptor alpha 4 subunit gene (CHRNA4). *Hum Genet* 96: 130
- Steinlein OK (2004) Nicotinic receptor mutations in human epilepsy. *Prog Brain Res* 145: 275-285
- Stern P, Behe P, Schoepfer R, Colquhoun D (1992) Single-channel conductances of NMDA receptors expressed from cloned cDNAs: comparison with native receptors. *Proc Biol Sci* 250: 271-277
- Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, Sheppard PO, O'Hara PJ, Heinemann SF (1994) Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins. *Neuron* 13: 1345-1357
- Stern-Bach Y, Russo S, Neuman M, Rosenmund C (1998) A point mutation in the glutamate binding site blocks desensitization of AMPA receptors. *Neuron* 21: 907-918
- Stewart AP, Gomez-Posada JC, McGeorge J, Rouhani MJ, Villarroel A, Murrell-Lagnado RD, Edwardson JM (2012) The Kv7.2/Kv7.3 heterotetramer assembles with a random subunit arrangement. *J Biol Chem* 287: 11870-11877
- Stewart AP, Haerteis S, Diakov A, Korbmayer C, Edwardson JM (2011) Atomic force microscopy reveals the architecture of the epithelial sodium channel (ENaC). *J Biol Chem* 286: 31944-31952
- Straub C, Tomita S (2012) The regulation of glutamate receptor trafficking and function by TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Curr Opin Neurobiol* 22: 488-495
- Stroebe D, Carvalho S, Paoletti P (2011) Functional evidence for a twisted conformation of the NMDA receptor GluN2A subunit N-terminal domain. *Neuropharmacology* 60: 151-158

- Sucher NJ, Lipton SA (1991) Redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex: regulation by oxidized glutathione. *J Neurosci Res* 30: 582-591
- Sugihara H, Moriyoshi K, Ishii T, Masu M, Nakanishi S (1992) Structures and properties of seven isoforms of the NMDA receptor generated by alternative splicing. *Biochem Biophys Res Commun* 185: 826-832
- Sukumaran M, Rossmann M, Shrivastava I, Dutta A, Bahar I, Greger IH (2011) Dynamics and allosteric potential of the AMPA receptor N-terminal domain. *Embo J* 30: 972-982
- Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA (1994) Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13: 929-936
- Sumioka A (2013) Auxiliary subunits provide new insights into regulation of AMPA receptor trafficking. *J Biochem* 153: 331-337
- Summerer D, Chen S, Wu N, Deiters A, Chin JW, Schultz PG (2006) A genetically encoded fluorescent amino acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9785-9789
- Sun L, Margolis FL, Shipley MT, Lidow MS (1998) Identification of a long variant of mRNA encoding the NR3 subunit of the NMDA receptor: its regional distribution and developmental expression in the rat brain. *FEBS Lett* 441: 392-396
- Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002) Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* 417: 245-253
- Surprenant A, North RA (2009) Signaling at purinergic P2X receptors. *Annu Rev Physiol* 71: 333-359
- Suzuki Y, Goetze TA, Stroebel D, Balasuriya D, Yoshimura SH, Henderson RM, Paoletti P, Takeyasu K, Edwardson JM (2013) Visualization of structural changes accompanying activation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors using fast-scan atomic force microscopy imaging. *J Biol Chem* 288: 778-784
- Swanson GT, Feldmeyer D, Kaneda M, Cull-Candy SG (1996) Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors. *J Physiol* 492 (Pt 1): 129-142
- Swanson GT, Green T, Sakai R, Contractor A, Che W, Kamiya H, Heinemann SF (2002) Differential activation of individual subunits in heteromeric kainate receptors. *Neuron* 34: 589-598
- Szobota S, Gorostiza P, Del Bene F, Wyart C, Fortin DL, Kolstad KD, Tulyathan O, Volgraf M, Numano R, Aaron HL, Scott EK, Kramer RH, Flannery J, Baier H, Trauner D, Isacoff EY (2007) Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron* 54: 535-545
- Szobota S, Isacoff EY (2010) Optical control of neuronal activity. *Annu Rev Biophys* 39: 329-348
- Taly A, Corringer PJ, Guedin D, Lestage P, Changeux JP (2009) Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 8: 733-750
- Tan SE, Wenthold RJ, Soderling TR (1994) Phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase C in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci* 14: 1123-1129
- Tanabe Y, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Nakanishi S (1992) A family of metabotropic glutamate receptors. *Neuron* 8: 169-179
- Tanaka Y, Bond MR, Kohler JJ (2008) Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells. *Mol Biosyst* 4: 473-480
- Tang LH, Aizenman E (1993) Allosteric modulation of the NMDA receptor by dihydrolipoic and lipoic acid in rat cortical neurons in vitro. *Neuron* 11: 857-863

- Tempel BL, Jan YN, Jan LY (1988) Cloning of a probable potassium channel gene from mouse brain. *Nature* 332: 837-839
- Thibodeaux GN, Liang X, Moncivais K, Umeda A, Singer O, Alfonta L, Zhang ZJ (2010) Transforming a pair of orthogonal tRNA-aminoacyl-tRNA synthetase from Archaea to function in mammalian cells. *PLoS One* 5: e11263
- Thompson AJ, Lester HA, Lummis SC (2010) The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Q Rev Biophys* 43: 449-499
- Tichelaar W, Safferling M, Keinanen K, Stark H, Madden DR (2004) The Three-dimensional Structure of an Ionotropic Glutamate Receptor Reveals a Dimer-of-dimers Assembly. *J Mol Biol* 344: 435-442
- Tomita S, Adesnik H, Sekiguchi M, Zhang W, Wada K, Howe JR, Nicoll RA, Brecht DS (2005) Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature* 435: 1052-1058
- Tomita S, Chen L, Kawasaki Y, Petralia RS, Wenthold RJ, Nicoll RA, Brecht DS (2003) Functional studies and distribution define a family of transmembrane AMPA receptor regulatory proteins. *J Cell Biol* 161: 805-816
- Tomita S, Fukata M, Nicoll RA, Brecht DS (2004) Dynamic interaction of stargazin-like TARPs with cycling AMPA receptors at synapses. *Science* 303: 1508-1511
- Tong G, Jahr CE (1994) Multivesicular release from excitatory synapses of cultured hippocampal neurons. *Neuron* 12: 51-59
- Tong Y, Brandt GS, Li M, Shapovalov G, Slimko E, Karschin A, Dougherty DA, Lester HA (2001) Tyrosine decaging leads to substantial membrane trafficking during modulation of an inward rectifier potassium channel. *J Gen Physiol* 117: 103-118
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1998) N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* 37: 14845-14851
- Torres GE, Egan TM, Voigt MM (1999) Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* 274: 6653-6659
- Tovar KR, Westbrook GL (2002) Mobile NMDA receptors at hippocampal synapses. *Neuron* 34: 255-264
- Trakhanov S, Vyas NK, Luecke H, Kristensen DM, Ma J, Quirocho FA (2005) Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry* 44: 6597-6608
- Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL (1998) Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* 18: 6163-6175
- Traynelis SF, Cull-Candy SG (1990) Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* 345: 347-350
- Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995) Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* 268: 873-876
- Traynelis SF, Wahl P (1997) Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *J Physiol* 503 (Pt 3): 513-531
- Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62: 405-496
- Triller A, Choquet D (2005) Surface trafficking of receptors between synaptic and extrasynaptic membranes: and yet they do move! *Trends Neurosci* 28: 133-139

- Truong K, Ikura M (2001) The use of FRET imaging microscopy to detect protein-protein interactions and protein conformational changes in vivo. *Curr Opin Struct Biol* 11: 573-578
- Tsai G, Coyle JT (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 165-179
- Tsetlin V, Kuzmin D, Kasheverov I (2011) Assembly of nicotinic and other Cys-loop receptors. *J Neurochem* 116: 734-741
- Turcatti G, Nemeth K, Edgerton MD, Meseth U, Talabot F, Peitsch M, Knowles J, Vogel H, Chollet A (1996) Probing the structure and function of the tachykinin neurokinin-2 receptor through biosynthetic incorporation of fluorescent amino acids at specific sites. *J Biol Chem* 271: 19991-19998
- Turetsky D, Garringer E, Patneau DK (2005) Stargazin modulates native AMPA receptor functional properties by two distinct mechanisms. *J Neurosci* 25: 7438-7448
- Ulbrich MH, Isacoff EY (2008) Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 14163-14168
- Uster PS, Pagano RE (1986) Resonance energy transfer microscopy: observations of membrane-bound fluorescent probes in model membranes and in living cells. *J Cell Biol* 103: 1221-1234
- Vaid M, Claydon TW, Rezazadeh S, Fedida D (2008) Voltage clamp fluorimetry reveals a novel outer pore instability in a mammalian voltage-gated potassium channel. *J Gen Physiol* 132: 209-222
- Valera S, Hussy N, Evans RJ, Adami N, North RA, Surprenant A, Buell G (1994) A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. *Nature* 371: 516-519
- Vance KM, Hansen KB, Traynelis SF (2012) GluN1 splice variant control of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *J Physiol*
- Vance KM, Hansen KB, Traynelis SF (2013) Modal gating of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Neuropharmacology* 71: 184-190
- Vance KM, Simorowski N, Traynelis SF, Furukawa H (2011) Ligand-specific deactivation time course of GluN1/GluN2D NMDA receptors. *Nat Commun* 2: 294
- Vandenberghe W, Nicoll RA, Bredt DS (2005) Interaction with the unfolded protein response reveals a role for stargazin in biosynthetic AMPA receptor transport. *J Neurosci* 25: 1095-1102
- Venskutonyte R, Frydenvang K, Gajhede M, Bunch L, Pickering DS, Kastrup JS (2011) Binding site and interlobe interactions of the ionotropic glutamate receptor GluK3 ligand binding domain revealed by high resolution crystal structure in complex with (S)-glutamate. *Journal of structural biology* 176: 307-314
- Veran J, Kumar J, Pinheiro PS, Athane A, Mayer ML, Perrais D, Mulle C (2012) Zinc potentiates GluK3 glutamate receptor function by stabilizing the ligand binding domain dimer interface. *Neuron* 76: 565-578
- Vicini S, Wang JF, Li JH, Zhu WJ, Wang YH, Luo JH, Wolfe BB, Grayson DR (1998) Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurophysiol* 79: 555-566
- Vieles P, Frezou C, Galsomias J, Bonniol A (1972) Etude physicochimique de la tricine et de ses complexes avec les ions de transition Co II, Ni II, Cu II, Zn II. *J. Chim. Phys. Physiochim. Biol.* 69: 869-874
- Vignes M, Collingridge GL (1997) The synaptic activation of kainate receptors. *Nature* 388: 179-182
- Vincent A, Bien CG, Irani SR, Waters P (2011) Autoantibodies associated with diseases of the CNS: new developments and future challenges. *Lancet Neurol* 10: 759-772
- Virdee S, Kapadnis PB, Elliott T, Lang K, Madrzak J, Nguyen DP, Riechmann L, Chin JW (2011) Traceless and site-specific ubiquitination of recombinant proteins. *J Am Chem Soc* 133: 10708-10711

- Virdee S, Ye Y, Nguyen DP, Komander D, Chin JW (2010) Engineered diubiquitin synthesis reveals Lys29-isopeptide specificity of an OTU deubiquitinase. *Nat Chem Biol* 6: 750-757
- Vissel B, Krupp JJ, Heinemann SF, Westbrook GL (2001) A use-dependent tyrosine dephosphorylation of NMDA receptors is independent of ion flux. *Nat Neurosci* 4: 587-596
- Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000) The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 26: 187-196
- Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer RH, Isacoff EY, Trauner D (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* 2: 47-52
- Vyklicky L (1990) NMDA receptors. *Physiol Bohemoslov* 39: 385-393
- Walstab J, Rappold G, Niesler B (2010) 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs. *Pharmacol Ther* 128: 146-169
- Wanamaker CP, Christianson JC, Green WN (2003) Regulation of nicotinic acetylcholine receptor assembly. *Ann N Y Acad Sci* 998: 66-80
- Wang J, Xie J, Schultz PG (2006) A genetically encoded fluorescent amino acid. *J Am Chem Soc* 128: 8738-8739
- Wang L, Schultz PG (2001) A general approach for the generation of orthogonal tRNAs. *Chem Biol* 8: 883-890
- Wang Q, Parrish AR, Wang L (2009) Expanding the genetic code for biological studies. *Chem Biol* 16: 323-336
- Wang W, Takimoto JK, Louie GV, Baiga TJ, Noel JP, Lee KF, Slesinger PA, Wang L (2007) Genetically encoding unnatural amino acids for cellular and neuronal studies. *Nat Neurosci* 10: 1063-1072
- Wang YS, Wu B, Wang Z, Huang Y, Wan W, Russell WK, Pai PJ, Moe YN, Russell DH, Liu WR (2010) A genetically encoded photocaged Nepsilon-methyl-L-lysine. *Mol Biosyst* 6: 1557-1560
- Watanabe J, Beck C, Kuner T, Premkumar LS, Wollmuth LP (2002) DRPEER: a motif in the extracellular vestibule conferring high Ca²⁺ flux rates in NMDA receptor channels. *J Neurosci* 22: 10209-10216
- Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1993) Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* 338: 377-390
- Watkins JC, Evans RH (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 21: 165-204
- Watkins JC, Jane DE (2006) The glutamate story. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S100-108
- Wei F, Wang GD, Kerchner GA, Kim SJ, Xu HM, Chen ZF, Zhuo M (2001) Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci* 4: 164-169
- Werner P, Voigt M, Keinänen K, Wisden W, Seeburg PH (1991) Cloning of a putative high-affinity kainate receptor expressed predominantly in hippocampal CA3 cells. *Nature* 351: 742-744
- Westbrook GL, Mayer ML (1987) Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature* 328: 640-643
- Weston MC, Gertler C, Mayer ML, Rosenmund C (2006) Interdomain interactions in AMPA and kainate receptors regulate affinity for glutamate. *J Neurosci* 26: 7650-7658
- Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* 44: 851-859

- Williams K (1994) Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 46: 161-168
- Williams K (1996) Separating dual effects of zinc at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Neurosci Lett* 215: 9-12
- Williams K, Dattilo M, Sabado TN, Kashiwagi K, Igarashi K (2003) Pharmacology of delta2 glutamate receptors: effects of pentamidine and protons. *J Pharmacol Exp Ther* 305: 740-748
- Wollmuth LP, Sobolevsky AI (2004) Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. *Trends Neurosci* 27: 321-328
- Wood MW, VanDongen HM, VanDongen AM (1995) Structural conservation of ion conduction pathways in K channels and glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4882-4886
- Wu LJ, Zhuo M (2009) Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics* 6: 693-702
- Wyllie DJ, Behe P, Colquhoun D (1998) Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J Physiol* 510 (Pt 1): 1-18
- Wyss DF, Wang YS, Eaton HL, Strickland C, Voigt JH, Zhu Z, Stamford AW (2012) Combining NMR and X-ray crystallography in fragment-based drug discovery: discovery of highly potent and selective BACE-1 inhibitors. *Top Curr Chem* 317: 83-114
- Xu Z, Chen RQ, Gu QH, Yan JZ, Wang SH, Liu SY, Lu W (2009) Metaplastic regulation of long-term potentiation/long-term depression threshold by activity-dependent changes of NR2A/NR2B ratio. *J Neurosci* 29: 8764-8773
- Yamazaki M, Araki K, Shibata A, Mishina M (1992) Molecular cloning of a cDNA encoding a novel member of the mouse glutamate receptor channel family. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 886-892
- Yamin G (2009) NMDA receptor-dependent signaling pathways that underlie amyloid beta-protein disruption of LTP in the hippocampus. *J Neurosci Res* 87: 1729-1736
- Yan J, Xu Y, Zhu C, Zhang L, Wu A, Yang Y, Xiong Z, Deng C, Huang XF, Yenari MA, Yang YG, Ying W, Wang Q (2011) Simvastatin prevents dopaminergic neurodegeneration in experimental parkinsonian models: the association with anti-inflammatory responses. *PLoS One* 6: e20945
- Yao GR, Zong YN, Gu SY, Zhou J, Xu HX, Mathews II, Jin RS (2011) Crystal structure of the glutamate receptor GluA1 N-terminal domain. *Biochem J* 438: 255-263
- Yao Y, Belcher J, Berger AJ, Mayer ML, Lau AY (2013) Conformational analysis of NMDA receptor GluN1, GluN2, and GluN3 ligand-binding domains reveals subtype-specific characteristics. *Structure* 21: 1788-1799
- Yao Y, Harrison CB, Freddolino PL, Schulten K, Mayer ML (2008) Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *EMBO J* 27: 2158-2170
- Yao Y, Mayer ML (2006) Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *J Neurosci* 26: 4559-4566
- Ye S, Huber T, Vogel R, Sakmar TP (2009) FTIR analysis of GPCR activation using azido probes. *Nat Chem Biol* 5: 397-399
- Ye S, Kohrer C, Huber T, Kazmi M, Sachdev P, Yan EC, Bhagat A, RajBhandary UL, Sakmar TP (2008) Site-specific incorporation of keto amino acids into functional G protein-coupled receptors using unnatural amino acid mutagenesis. *J Biol Chem* 283: 1525-1533
- Ye S, Riou M, Carvalho S, Paoletti P (2013) Expanding the genetic code in *Xenopus laevis* oocytes. *Chembiochem* 14: 230-235

- Ye S, Zaitseva E, Caltabiano G, Schertler GF, Sakmar TP, Deupi X, Vogel R (2010) Tracking G-protein-coupled receptor activation using genetically encoded infrared probes. *Nature* 464: 1386-1389
- Yellen G (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q Rev Biophys* 31: 239-295
- Yevenes GE, Zeilhofer HU (2011) Allosteric modulation of glycine receptors. *Br J Pharmacol* 164: 224-236
- Yuan H, Hansen KB, Vance KM, Ogden KK, Traynelis SF (2009) Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *J Neurosci* 29: 12045-12058
- Zhang J, Diamond JS (2009) Subunit- and pathway-specific localization of NMDA receptors and scaffolding proteins at ganglion cell synapses in rat retina. *J Neurosci* 29: 4274-4286
- Zhang L, Zheng X, Paupard MC, Wang AP, Santchi L, Friedman LK, Zukin RS, Bennett MV (1994) Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10883-10887
- Zhang W, Robert A, Vogensen SB, Howe JR (2006) The relationship between agonist potency and AMPA receptor kinetics. *Biophys J* 91: 1336-1346
- Zheng F, Erreger K, Low CM, Banke T, Lee CJ, Conn PJ, Traynelis SF (2001) Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nat Neurosci* 4: 894-901
- Zhu S, Stroebel D, Yao CA, Taly A, Paoletti P (2013) Allosteric signaling and dynamics of the clamshell-like NMDA receptor GluN1 N-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol* 20: 477-485
- Zonouzi M, Renzi M, Farrant M, Cull-Candy SG (2011) Bidirectional plasticity of calcium-permeable AMPA receptors in oligodendrocyte lineage cells. *Nat Neurosci* 14: 1430-1438
- Zuo J, De Jager PL, Takahashi KA, Jiang W, Linden DJ, Heintz N (1997) Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature* 388: 769-773