



Thèse présentée pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université Louis Pasteur
Strasbourg I

Discipline : Sciences du Vivant
Spécialité : Pharmacologie Moléculaire et Pharmacochimie

Alexandre Mourot

Structure et Dynamique du Récepteur Nicotinique

Soutenue publiquement le 01 Décembre 2004

Membres du jury :

Directeur de Thèse :	Professeur Maurice Goeldner, Strasbourg
Rapporteur Interne :	Docteur Jean-Luc Galzi, Strasbourg
Rapporteur Externe :	Professeur Ernst Bamberg, Frankfurt am Main
Rapporteur Externe :	Docteur Pierre-Jean Corringer, Paris
Examineur :	Docteur Florence Kotzyba-Hibert, Strasbourg

à mes Parents

à mon frère Richard

à mes soeurs Edwige et Sandrine

à ma tit' fourmi

La réalité est ce qui ne disparaît pas lorsque l'on cesse d'y
croire.

Philip K. Dick

Sommaire

Chapitre 1: Introduction générale	1
I) Historique du Récepteur Nicotinique	2
II) Les récepteurs ionotropes	3
Chapitre 2: Les Récepteurs Nicotiniques de l'Acétylcholine	4
I) La synapse cholinergique	5
II) Les différents sous-types de nAChRs: localisations et aspects physiologiques	6
A) Les récepteurs musculaires et de torpille	6
B) Les récepteurs neuronaux	7
III) Structure du nAChR	10
A) Topologie du nAChR	10
B) Sites de liaison du nAChR	11
Sites agoniste (ou sites ACh)	11
Sites des bloquants non-compétitifs du canal	12
Site(s) agoniste non-compétitif	12
Site du calcium	12
Site du zinc	13
Site ivermectine	13
Site des stéroïdes	13
Site de l'ATP	14
Site(s) des polyamines	14

Site amyloïde β	14
Site de l'acide kynurénique (KYNA)	15
Site albumine?	15
Site des neuropeptides?	15
Site de l'hormone prostaglandine E2?	16
D'autres sites	16
C) Structure du nAChR de torpille obtenue par M.E.	16
Structure générale du nAChR de torpille	16
Structure du domaine synaptique	17
Structure du domaine transmembranaire	18
Structure du domaine cytoplasmique	19
D) Structure du domaine transmembranaire (sites BNCs)	19
Structure du canal (site de haute affinité des BNCs)	19
Structure de l'interface lipides-protéine (sites de basse affinité des BNCs)	23
E) Une structure RX du nAChR pour bientôt ?	26
F) L'AChBP, une protéine homologue au domaine extracellulaire du nAChR	29
Localisation et fonction de l'AChBP	29
Homologie avec les nAChRs	29
Structure de l'AChBP	30
Structure des sites ACh	31
G) Structure du domaine extracellulaire du nAChR (sites ACh)	32
Structure générale du domaine	33
Localisation de la MIR	34
Le site agoniste	34
IV) Dynamique du nAChR	43
A) Le nAChR : une protéine allostérique	43
Cinétiques d'ouverture-fermeture du canal	43
Désensibilisation du nAChR	45
Modèles allostériques	48
B) Régulation des équilibres conformationnels	49
Nature des sous-unités	50

Mutations ponctuelles naturelles	50
Mutations ponctuelles expérimentales	51
Ligands endogènes	52
Ligands exogènes	52
Phosphorylation	52
Protéines	53
Contraintes physico-chimiques	53
C) Dynamique structurale du nAChR	54
Dynamique du domaine transmembranaire	54
Dynamique du domaine extracellulaire	55
Connection entre les deux domaines et mécanisme général	57
 V) But de la présente étude	 61

 Chapitre 3: Synthèse et caractérisations d'<u>AC5</u>	 62
 I) Principe du marquage de photoaffinité	 63
 II) Nouvelle Synthèse de [³H]<u>AC5</u>	 65
 III) Caractérisation photochimique d'<u>AC5</u>	 67
 IV) La torpille comme source de nAChRs	 68
 V) Caractérisation pharmacologique d'<u>AC5</u>	 70
A) Liaison d' <u>AC5</u> au site agoniste	70
Expériences de compétition	70
Expériences de saturation	71
B) Liaison d' <u>AC5</u> au site canal	72
C) Propriétés agonistes d' <u>AC5</u>	73
 VI) Conclusion	 75

VII) Partie expérimentale chimique	76
A) Généralités	76
B) Synthèse d' <u>AC5</u> non-radiomarké	77
C) Synthèse du radioligand [³ H] <u>AC5</u>	86
 VIII) Partie expérimentale biochimique	 91
A) Généralités	91
B) Préparation membranaire	91
C) Dosage de sites [¹²⁵ I]α-BgTx	92
D) Mesure d'hydrolyse d'AC5 en préparation membranaire	93
E) Expériences de compétition - mesure en vitesse initiale	93
F) Expériences de compétition - mesure à l'équilibre	93
G) Expériences de saturation	94

 Chapitre 4: Photomarquage analytique du nAChR désensibilisé	 95
 I) Profils d'incorporation d'<u>AC5</u>	 96
A) <u>AC5</u> s'incorpore majoritairement sur γ et δ	97
Construction du modèle moléculaire	97
Docking d' <u>AC5</u> dans le modèle	99
B) <u>AC5</u> s'incorpore minoritairement sur α	99
Photomarquage en absence d'inhibiteurs d'AChE	100
Photomarquage avec [³ H] <u>PH5</u>	101
C) <u>AC5</u> ne s'incorpore pas sur β	101
Immunomarquage	102
Protection sélective du marquage	103
 II) Analyse pharmacologique du photomarquage	 105
A) Stoechiométrie de l'incorporation	105

B) Saturabilité du marquage	105
C) Inhibition par différents agents cholinergiques	107
III) Conclusion	109
IV) Partie expérimentale	110
A) Généralités	110
B) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [³ H] <u>AC5</u>	110
C) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [³ H] <u>PH5</u>	111
D) Construction du modèle moléculaire	111
E) Docking d'AC5 et de la nicotine dans le modèle	111
F) Immunomarquage	112

Chapitre 5: Photomarquage résolu en temps	113
I) Mise au point du dispositif expérimental	114
A) Description de l'appareil de « stopped-flow »	114
B) Photolyse d' <u>AC5</u>	115
C) Application au photomarquage du nAChR de torpille	115
II) Analyse du photomarquage résolu en temps	117
A) Evolution de la photoincorporation sur chaque sous-unité	117
B) Répartition de la photoincorporation	118
C) Limites de la technique	119
D) Modèle allostérique proposé	120
III) Conclusion	125
IV) Partie expérimentale	127
A) Généralités	127

B) Photolyse d' <u>AC5</u>	127
C) Irradiation en cinétique rapide	127
D) Irradiation en cinétique lente ou à l'équilibre	128

Chapitre 6: Photomarquage préparatif du nAChR désensibilisé 129

I) Mise au point du photomarquage préparatif 130

A) Stratégie utilisée	130
B) Principe du MALDI-TOF	132
C) Mise au point de la protéolyse « in gel » du nAChR de torpille	133
D) Analyse MALDI-TOF du photomarquage par <u>AC5</u>	134

II) Analyse du photomarquage préparatif par [³H]AC5 136

A) Extraction des peptides	136
B) Première purification CLHP des peptides	137
Purification CLHP des peptides	137
Analyse MALDI-TOF	138
C) Seconde purification CLHP des peptides	138
Purification CLHP des peptides	139
Analyse MALDI-TOF	139
Séquençage	140

III) Conclusion 142

IV) Partie expérimentale 144

A) Généralités	144
B) Photomarquage préparatif par [³ H] <u>AC5</u>	145
C) Photomarquage analytique par <u>AC5</u>	145
D) Protéolyse « <i>in acrylamido</i> » des sous-unités γ et δ par les protéases V8, EndoLys-C et Trypsine	145
Récupération des sous-unités	145

Réduction/alkylation	146
Protéolyse “in gel”	146
Extraction des peptides du gel	146
Concentration “zip-tip” des peptides	147
E) Purification CLHP des peptides	147
F) MALDI-TOF	148
Préparation des échantillons	148
Analyse des échantillons	148
G) Séquençage	148

Conclusion générale	149
---------------------	-----

Annexes	154
Abréviations	155
Références bibliographiques	158
Sites internet d'intérêt	183
Articles scientifiques	184

Chapitre 1 : Introduction Générale

I)	Historique du Récepteur Nicotinique	2
II)	Les Récepteurs Ionotropes	3

I) Historique du Récepteur Nicotinique

Le récepteur nicotinique cholinergique (nAChR pour Nicotinic Acetylcholine Receptor) a indiscutablement la plus longue histoire d'études expérimentales concernant un récepteur.

Dès le début du siècle dernier, John Newport Langley avait postulé l'existence de *récepteurs* engagés dans la reconnaissance et la transduction de signaux synaptiques chimiques appelés neuromédiateurs (Langley, 1907). Dans ses études, il a montré que la nicotine produit une contraction tonique de certains muscles de grenouille et que cette contraction est abolie par le curare, fondant ainsi les premières bases théoriques de la pharmacologie moléculaire.

Quelques années plus tard, Loewi et Dale reconnaissent l'acétylcholine comme neurotransmetteur endogène. Dale distingue l'action de la muscarine et de la nicotine (Dale, 1914), et parvient ainsi à différencier deux familles de récepteurs à l'acétylcholine distinctes pharmacologiquement (maintenant connues pour être aussi structurellement différentes). Ces deux produits naturels ont donné leur nom aux deux familles de récepteur cholinergiques: le récepteur muscarinique (mAChR, récepteur métabotrope à sept segments transmembranaires) et le récepteur nicotinique (nAChR, récepteur ionotrope).

A la fin des années trente, à la station balnéaire d'Arcachon, Feldberg, Fessard et Nachmansohn mirent en évidence, sur le poisson électrique de torpille, une transduction chimioélectrique (Feldberg, 1940). Ces auteurs découvraient ainsi l'incroyable richesse en composants biochimiques de la synapse de l'organe électrique de ces poissons.

Les approches biochimiques pour élucider la structure et la fonction du nAChR ont connu un nouvel essor dans les années soixante dix, suite à la découverte d'une toxine de venin de serpent (l' α -bungarotoxine) (Changeux et al., 1970). Les très hautes affinité et sélectivité de cette toxine pour le récepteur nicotinique ont permis de purifier cette protéine membranaire post-synaptique (Cohen et al., 1972) et d'en étudier plus en détail la fonctionnalité.

Au début des années quatre-vingt, les premières sous-unités du nAChR ont été clonées (Noda et al., 1982) (Noda et al., 1983) (Noda et al., 1983) (Claudio et al., 1983; Devillers-Thiery et al., 1983), initiant ainsi l'ère de l'analyse moléculaire du nAChR, qui sera décrite plus en détail dans le prochain chapitre.

	Ligand	Récepteur	Perméabilité	Nombre de sous-unités paralogues connues	Référence
Chez les Vertébrés	Acétylcholine	nAChR	Cationique	≥ 16	(Noda et al., 1982)
	GABA	GABA _{A/C} R	Anionique	≥ 19	(Schofield et al., 1987)
	Glycine	GlyR	Anionique	≥ 5	(Grenningloh et al., 1987)
	Sérotonine	5-HT ₃ R	Cationique	≥ 2	(Maricq et al., 1991)
	Zn ²⁺	ZAC	Cationique	1	(Davies et al., 2003)
Seulement chez les Invertébrés	Glutamate	GluCl	Anionique	≥ 2	(Cully et al., 1994)
	Sérotonine	MOD-1	Anionique	1	(Ranganathan et al., 2000)
	Histamine	HisCl-1	Anionique	1	(Gisselmann et al., 2002)
	GABA	EXP-1	Cationique	1	(Beg & Jorgensen, 2003)

Tableau 1-1 : Membres actuellement connus des récepteurs canaux de la famille à boucle cystéine. Les paralogues sont des homologues apparus par duplication dans le même organisme. La première sous-unité clonée de chaque membre est indiquée en référence.

II) Les Récepteurs Ionotropes

Le nAChR appartient à la grande famille des récepteurs canaux extracellulaires (LGIC¹ ou Ligand Gated Ion Channel). Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la transmission synaptique. Après liaison du neuromédiateur, le canal s'ouvre et rend la membrane temporairement perméante aux ions.

Les récepteurs ionotropes sont classés en trois grandes familles :

- La superfamille des récepteurs à « boucle-cystéine » (Cys-Loop receptor en anglais) ou récepteurs nicotinoïdes : il s'agit de la famille la plus représentée. Ce sont des pentamères qui peuvent être perméants soit aux cations, soit aux anions et qui possèdent tous un pont disulfure très conservé. Le nAChR fait partie de cette superfamille dont les membres sont brièvement présentés dans le **Tableau 1-1**.
- La superfamille des récepteurs cationiques du glutamate : cette famille de récepteurs tétramériques comprend notamment les récepteurs AMPA, Kainate et NMDA.
- La superfamille des récepteurs de l'ATP: récepteurs P2x de structure trimérique.

Ces deux dernières familles de récepteur, en raison de leur faible analogie structurale avec le nAChR, ne seront pas (ou peu) abordées dans ce manuscrit.

Au sein de la famille des récepteurs à boucle cystéine, les différents récepteurs partagent des homologies de séquence (de 25 à 60 % d'identité) ainsi que des éléments structuraux communs.

En raison de l'existence de sources naturelles riches en récepteur nicotinique, le domaine de connaissance des nAChRs a été très largement approfondi. Bien qu'il n'en soit pas de même pour les autres membres de la famille des récepteurs à boucle cystéine, les connaissances acquises ont permis de supposer que cette famille de récepteurs possède une architecture de base commune.

Les différents sous-types de récepteurs nicotiques ainsi que leurs caractéristiques physiologiques, pharmacologiques, biochimiques, biophysiques et structurales, seront décrites plus en détail dans le chapitre suivant.

¹ <http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/LGIC.html> est une base de donnée sur l'internet qui regroupe les informations disponibles (séquences, alignements, études phylogénétiques, coordonnées atomiques et bibliographie) de tous les récepteurs canaux extracellulaires.

- 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.
- Claudio T, Ballivet M, Patrick J, Heinemann S. **1983.** *Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor gamma subunit.* Proc Natl Acad Sci U S A 80:1111-1115.
- Cohen JB, Weber M, Huchet M, Changeux JP. **1972.** *Purification from Torpedo marmorata electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein.* FEBS Lett 26:43-47.
- Dale H. **1914.** *The action of certain esters of choline, and their relation to muscarine.* J. Pharmacol. Exp. Ther. 6:147-190.
- Devillers-Thiery A, Giraudat J, Bentaboulet M, Changeux JP. **1983.** *Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain.* Proc Natl Acad Sci U S A 80:2067-2071.
- Feldberg W, Fessard, A., Nachmansohn, D. **1940.** *The cholinergic nature of the nervous supply to electric organ of the Torpedo (Torpedo marmorata).* J. Physiol. 97:3-4.
- Langley JN. **1907.** *On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances.* J. Physiol. 36:347-384.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T, Numa S. **1982.** *Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence.* Nature 299:793-797.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. **1983.** *Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits.* Nature 302:528-532.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. **1983.** *Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences.* Nature 301:251-255.

Chapitre 2 :

Les Récepteurs Nicotiniques

de l'Acétylcholine

I)	La Synapse Cholinergique	5
II)	Les Différents Sous-types de nAChRs: Localisations et Aspects Physiologiques	6
A)	Les récepteurs musculaires et de torpille	6
B)	Les récepteurs neuronaux	7
III)	Structure du nAChR	10
A)	Topologie du nAChR	10
B)	Sites de liaison du nAChR	11
C)	Structure du nAChR de torpille obtenue par M.E.	16
D)	Structure du domaine transmembranaire (sites BNCs)	19
E)	Une structure RX du nAChR pour bientôt?	26
F)	L'AChBP, une protéine homologue au domaine extracellulaire du nAChR	29
G)	Structure du domaine extracellulaire du nAChR (sites ACh)	32
IV)	Dynamique du nAChR	43
A)	Le nAChR : une protéine allostérique	43
B)	Régulation des équilibres conformationnels	49
C)	Dynamique structurale du nAChR	54
V)	But de la présente étude	61

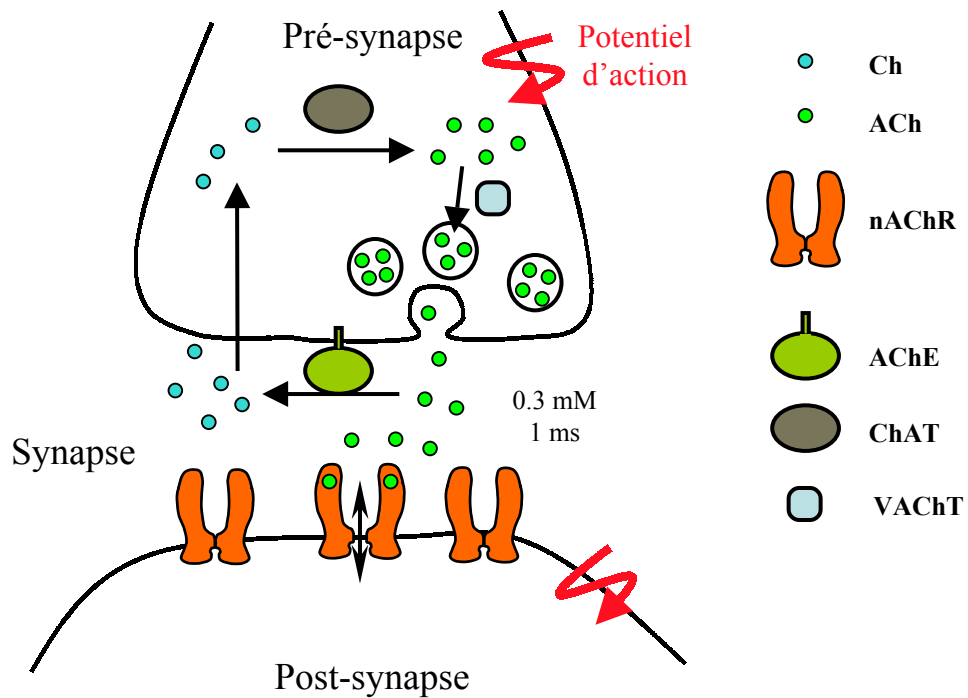


Figure 2-1: Fonctionnement d'une synapse cholinergique. L'élément présynaptique renferme la machinerie nécessaire à la synthèse (ChAT), au stockage, à la libération et à l'inactivation (AChE) du neurotransmetteur (ACh). L'élément post-synaptique, spécialisé dans la réception des messages, renferme dans sa membrane plasmique les protéines réceptrices du neurotransmetteur : les nAChRs.

I) La Synapse Cholinergique

Les nAChRs sont des récepteurs canaux situés au niveau des synapses cholinergiques (**Figure 2-1**). Ils contribuent, avec l'acétylcholinestérase (AChE), à réguler l'intensité et la durée du signal.

En effet, l'influx nerveux se propageant dans le bouton présynaptique provoque une libération rapide (~ 1 ms) d'une forte concentration (0,1-1 mM) d'acétylcholine (ACh) dans la fente synaptique. La liaison de l'ACh sur le nAChR va activer le récepteur, activation qui se traduit par un bouleversement structural et qui aboutit à l'ouverture du canal. La membrane post-synaptique devient alors temporairement perméable aux cations. Ce flux entrant de Na^+ et sortant de K^+ provoque la dépolarisation de la membrane et la transmission de l'influx nerveux ou la contraction musculaire.

Le nAChR va ensuite se refermer et, en présence continue d'ACh, entrer dans un état désensibilisé. Le nAChR existe donc au moins dans trois états différents : un état de repos fermé et sensible à l'ACh, un état actif ouvert et un état désensibilisé fermé. La signification physiologique d'un tel état réfractaire dans la synapse est encore discutée, et il n'est pas sûr que le nAChR puisse l'atteindre dans les conditions synaptiques normales (Clements, 1996).

En effet, les molécules d'acétylcholine sont ensuite hydrolysées par l'AChE en choline et acétate. La choline est alors transportée dans le bouton présynaptique, où elle va être reconvertie en ACh par la choline acétyltransférase (ChAT).

Au niveau de la synapse cholinergique, un signal chimique (ACh) est donc converti en signal électrique par l'intermédiaire du nAChR.

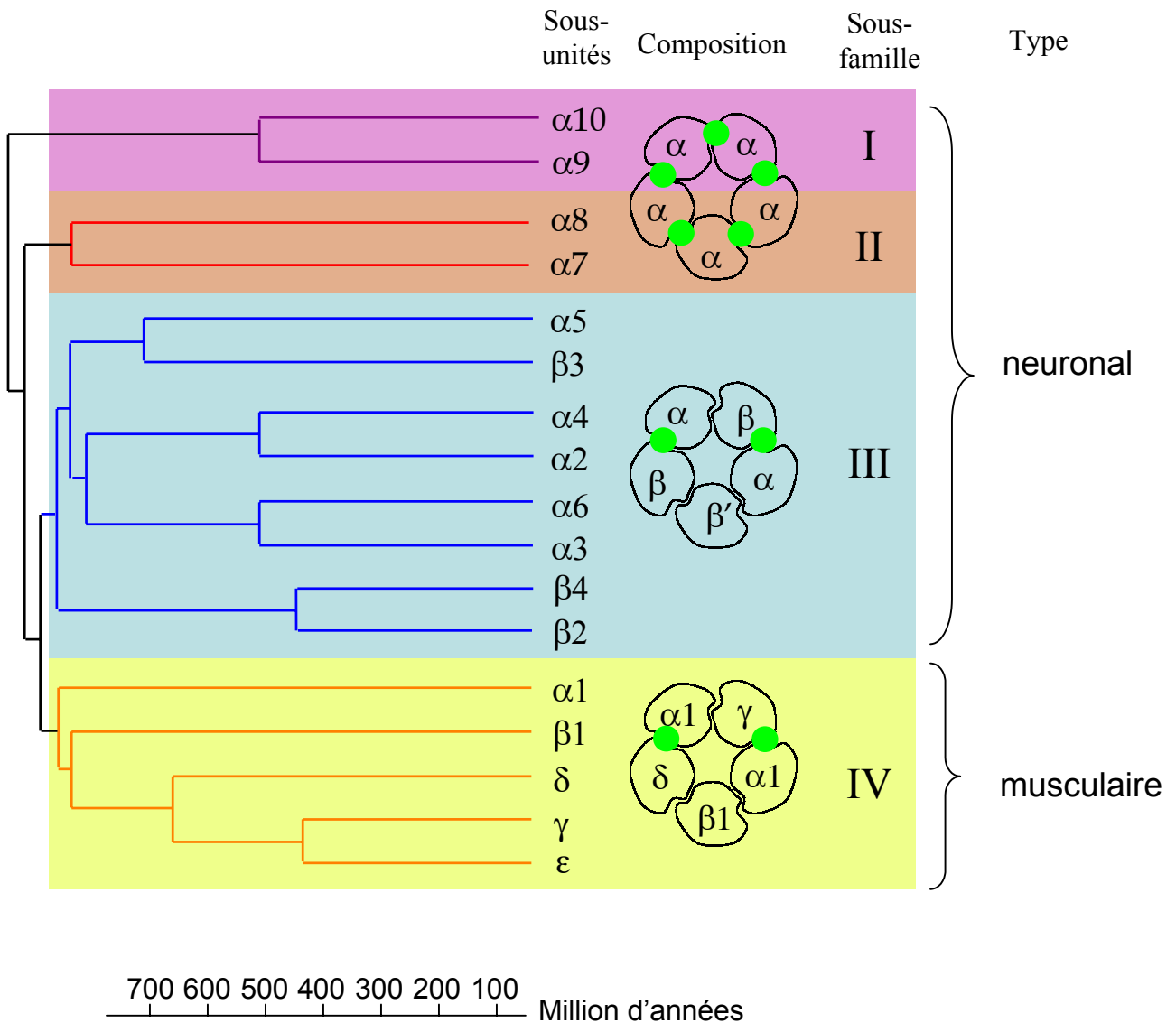


Figure 2-2: Arbre phylogénétique, classement et composition des 17 sous-unités identifiées de nAChR de vertébrés. On distingue les trois premières familles (de type neuronal) et la quatrième (de type musculaire). Les ronds verts représentent les sites ACh. La sous-unité β' du sous-type III peut être de nature β ou α, d'après (Le Novere et al., 2002). Les mises à jours de cette arbre peuvent être trouvées sur le site <http://www.pasteur.fr/recherche/banques/LGIC/catphylogen.html>.

II) Les Différents Sous-types de nAChRs : Localisations et Aspects Physiologiques

Les nAChRs sont des pentamères composés de sous unités homologues qui s'arrangent symétriquement autour d'un axe perpendiculaire à la membrane. Ils sont présents à la fois dans le système central et le système périphérique. Selon les sous-types, ils sont composés de cinq sous-unités identiques (homopentamères) ou différentes (hétéropentamères). Les analyses des séquences ont montré que toutes les sous-unités des nAChRs, mais aussi celles des autres récepteurs ionotropes de la famille à boucle cystéine (**Tableau 1-1**) appartiennent à la même famille de gènes. Des études basées sur les similitudes de séquences (Le Novère & Changeux, 1995; Ortells & Lunt, 1995; Le Novère et al., 2002) permettent de tracer des arbres phylogénétiques et de séparer les nAChRs en quatre grandes familles (**Figure 2-2**) : les trois premières familles sont de type neuronal et la quatrième de type musculaire.

A) Les Récepteurs Musculaires et de Torpille

Les récepteurs nicotiques de type musculaire sont localisés de manière très dense dans les membranes post-synaptiques du myocyte (muscle strié squelettique) au niveau de la jonction neuromusculaire ou plaque motrice. L'activation de ces récepteurs par l'ACh se traduit par une initiation de la contraction musculaire. Ces nAChRs sont impliqués dans certaines maladies neuromusculaires comme *Myasthenia gravis* (maladie auto-immune causée par des anticorps dirigés contre les nAChRs. Ces anticorps inhibent la liaison de l'ACh et provoquent des paralysies musculaires, pour revue voir (Lindstrom, 2002)) ou les syndromes myasténiques congénitaux CMS (maladie congénitale dont certaines sont dues à une mutation au niveau d'une sous-unité du nAChR, pour revue voir (Engel et al., 2003)).

Les nAChRs de torpille sont situés de part et d'autre de l'épine dorsale, au niveau des organes électriques (**Figure 2-3**). L'organe électrique de torpille est composé quasi-exclusivement de terminaisons nerveuses sécrétant l'ACh (500 à 100 fois plus de synapses que dans un muscle !) et de muscles modifiés, appelés électrocytes ou électroplaques. Au niveau post-synaptique de ces électroplaques sont alignés, de manière très dense, quasi cristalline, un nombre impressionnant de nAChRs sous forme de dimères. L'électroplaque reçoit une innervation effectrice sur l'une de ses faces, créant ainsi un dipôle. Plusieurs

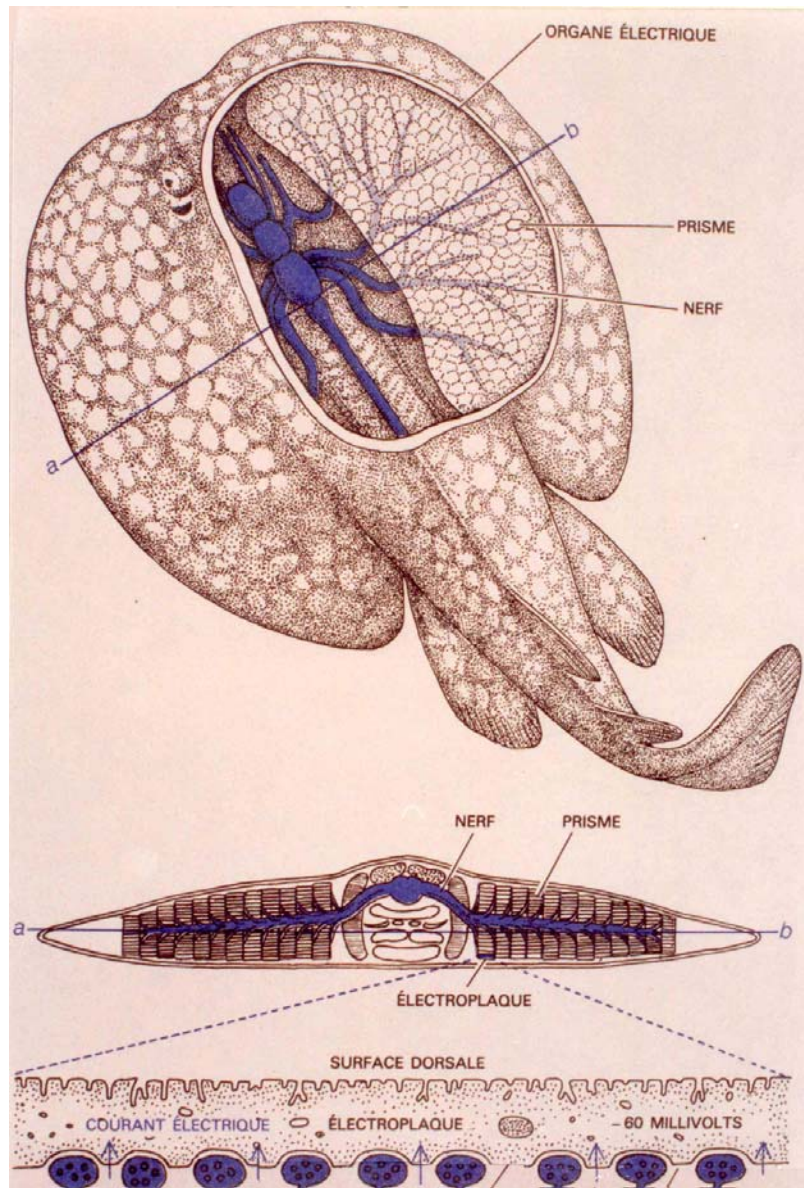


Figure 2-3. Torpille et fonctionnement de l'électroplaque. L'organe électrique de la torpille est constitué d'un empilement d'électroplaques. Lors d'une décharge, une différence de potentiel (ΔV) est appliquée entre les cellules polarisées.

milliers d'électroplaques sont empilées à la façon des éléments d'une batterie montés en série, ce qui permet d'atteindre des décharges très intenses. L'organe électrique est ainsi capable de délivrer des décharges suffisamment importantes (jusqu'à 40 V dans l'air) pour assommer des proies ou pour décourager des prédateurs. La plupart des propriétés biochimiques et biophysiques de base des nAChRs ont été établies grâce aux études intensives menées sur ce récepteur de torpille disponible en quantité non négligeable (pour revue voir (Whittaker, 1998)).

Il existe cinq types de sous unités musculaires : $\alpha 1$, $\beta 1$ ², γ , δ et ε (**Figure 2-2**). Les quatre premières sont exprimées dans le muscle embryonnaire et l'organe électrique de torpille. C'est au cours de l'innervation que la sous-unité γ est substituée par la sous-unité homologue ε afin de former le récepteur musculaire adulte ou mature (Gu & Hall, 1988). Cependant, une exception a été relevée au niveau des muscles extra-oculaires dans lesquels le récepteur adulte est exprimé avec les deux sous unités γ et ε (Horton et al., 1993). Par ailleurs, une autre isoforme de la sous-unité γ , dans laquelle il manque 52 résidus, a été identifiée dans la lignée cellulaire musculaire C2C12 de souris (Mileo et al., 1995).

B) Les Récepteurs Neuronaux

Contrairement à leurs homologues musculaires qui jouent un rôle pivot dans l'initiation de la contraction musculaire, les récepteurs neuronaux exercent plutôt une influence modulatrice sur le SNC. Ils peuvent être présents également du côté présynaptique où ils jouent un rôle de contrôle et de modulation de la libération de divers neurotransmetteurs. Cependant, étant donné leur implication dans de nombreuses maladies (Alzheimer, Parkinson, Schizophrénie, Syndrome de Tourette, Trouble du Déficit de l'Attention et de l'Hyperactivité ADHD...) et leur rôle de cible pharmaceutique (analgésie, neuroprotection, dépendance à la nicotine...), ils font l'objet de nombreuses études.

Ils sont formés de sous unités α et β homologues, mais néanmoins divergentes. Ces différences leur confèrent une grande diversité de combinaisons (plus de quatre mille théoriquement) probablement à l'origine de la distribution tissulaire et cellulaire, ainsi que de la spécificité pharmacologique. Cependant, l'expression hétérologue dans des ovocytes de xénope et dans des cellules de mammifères a établi certaines lois d'assemblage qui limitent le

² Par souci de simplicité, les sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ seront appelées α et β dans la suite de ce manuscrit.

Sous-type de nAChR	Sous-unités	Combinaisons	Références	
			Expression ¹	Natif ²
Musculaire (IV)	$\alpha 1, \beta 1, \gamma, \delta$ et ϵ	$\alpha 1\beta 1\gamma\delta$	Mishina et al., 1986	
		$\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$	Mishina et al., 1986	
Neuronal (III)	$\alpha 2\text{-}\alpha 6$ et $\beta 2\text{-}\beta 4$	$\alpha 2\beta 2$	Papke et al., 1989	
		$\alpha 2\beta 4$	Duvoisin et al., 1989	
		$\alpha 3\beta 2$	Papke et al., 1989	
		$\alpha 3\beta 4$	Duvoisin et al., 1989	
		$\alpha 4\beta 2$	Papke et al., 1989	Champtiaux et al., 2003
		$\alpha 4\beta 4$	Duvoisin et al., 1989	
		$\alpha 6\beta 2$	Fucile et al., 1998	Champtiaux et al., 2003
		$\alpha 6\beta 4$	Gerzanich et al., 1997	Vailati et al., 1999
		$\alpha 2\alpha 5\beta 2$		Balestra et al., 2000
		$\alpha 3\alpha 5\beta 2$	Wang et al., 1996	
		$\alpha 3\alpha 5\beta 4$	Wang et al., 1996	Conroy et Berg, 1995
		$\alpha 3\alpha 6\beta 2$	Kuryatov et al., 2000	
		$\alpha 3\alpha 6\beta 4$	Fucile et al., 1998	Vailati et al., 1999
		$\alpha 3\beta 3\beta 4$	Groot-Kormelink et al., 1998	
		$\alpha 4\alpha 5\beta 2$	Ramirez-Latorre et al., 1996	
		$\alpha 4\alpha 6\beta 2$		Champtiaux et al., 2003
		$\alpha 5\alpha 6\beta 2$	Kuryatov et al., 2000	
		$\alpha 6\beta 3\beta 4$	Kuryatov et al., 2000	Vailati et al., 1999
		$\alpha 6\beta 2\beta 3(\alpha 4)$		Lena et al., 1999
		$\alpha 3\alpha 5\beta 2\beta 4$		Olale et al., 1997
		$\alpha 3\alpha 5\beta 3\beta 4$		Conroy and Berg, 1995
		$\alpha 3\alpha 6\beta 3\beta 6$		Vailati et al., 1999
		$\alpha 4\alpha 5\alpha 6\beta 2$		Klink et al., 2001
		$\alpha 4\beta 2\beta 3\beta 4$		Forsayeth and Kobrin, 1997
Neuronal (II)	$\alpha 7$ et $\alpha 8$	$\alpha 7$	Couturier et al., 1990	Chen et Patrick, 1997 Drisdel et Green, 2000
		$\alpha 8$	Gotti et al., 1994	
		$\alpha 7\beta 2$	Khiroug et al., 2002	
		$\alpha 7\beta 3$	Palma et al., 1999	
		$\alpha 7\alpha 8$		Gotti et al., 1994 Anand et al., 1993 Keyser et al., 1993
		$\alpha 5\alpha 7\beta 2$	Girod et al., 1999	
Neuronal (I)	$\alpha 9$ et $\alpha 10$	$\alpha 9$	Elgoyhen et al., 1994	
		$\alpha 9\alpha 10$	Elgoyhen et al., 2001	

Tableau 2-1 : Diversité de combinaisons des sous-unités de nAChRs. Les références citées montrent l'évidence soit de la fonctionnalité des récepteurs par expression hétérologue ¹, soit de leur existence dans des systèmes natifs ². Dans ce dernier cas, ces combinaisons n'excluent pas la participation d'autres sous-unités dans la formation des complexes. Pour les récepteurs de type musculaires, de nombreuses expressions hétérologues ont été effectuées avec moins de quatre sous-unités, dont certaines ont donné des récepteurs fonctionnels. Etant donné la certitude de la composition des récepteurs musculaires en système natif, ces expériences ne sont pas citées ici. D'après (Millar, 2003).

nombre de sous-types de nAChRs pouvant exister (heureusement pour les pharmacologistes!). Par exemple $\alpha 2$, $\alpha 3$ ou $\alpha 4$ peuvent former des récepteurs fonctionnels avec $\beta 2$ ou $\beta 4$, alors que $\alpha 5$ et $\beta 3$ en sont généralement incapables.

Dans les systèmes natifs, la connaissance de la composition des nAChRs est souvent limitée et seulement un petit nombre de sous-types majoritaires ont été identifiés. Ils incluent le type $\alpha 4\beta 2$, qui est relativement abondant dans le CNS (plus de 90% des sites de haute affinité pour la [^3H]-Cytisine dans le cerveau de rat (Flores et al., 1992)). Il a pu être établi que ce récepteur était de stœchiométrie $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ (Cooper et al., 1991). Cependant, d'autres combinaisons ($\alpha 2\beta 2$, $\alpha 3\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$...) et des combinaisons plus complexes ($\alpha 3\beta 4\alpha 5$, $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$...) peuvent exister (Conroy & Berg, 1995). Les sous unités $\alpha 7$ (Couturier et al., 1990), $\alpha 8$ (Keyser et al., 1993) et $\alpha 9$ (Elgoyhen et al., 1994) se distinguent par contre par leur capacité à former des homomères (symétrie d'ordre 5 parfaite) dans les systèmes d'expression, bien que des hétéromères $\alpha 7\alpha 8$ (Gotti et al., 1994) et $\alpha 9\alpha 10$ (Elgoyhen et al., 2001) puissent exister. La sous-unité $\alpha 10$ ne forme des récepteurs fonctionnels que lorsqu'elle est co-exprimée avec $\alpha 9$ (Sgard et al., 2002). La sous-unité $\alpha 7$, trouvée initialement dans le lobe optique du poulet, est localisée dans le système limbique, l'hippocampe et le cortex. La sous-unité $\alpha 8$ n'a été trouvée que dans le lobe optique de poulet et est absente chez les mammifères. Les sous-unités $\alpha 9$ et $\alpha 10$ sont localisées dans les tissus épithéliaux et musculaires, mais n'ont jamais été identifiées dans le CNS, et ne devraient donc logiquement pas être classifiées neuronales. Le **Tableau 2-1** résume, de manière sûrement non exhaustive, les différentes combinaisons observées in vitro ou in vivo. Pour une revue récente, voir (Millar, 2003).

Tous ces homo- et hétéromères ont ainsi des pharmacologies qui leur sont propres. Ils montrent notamment des cinétiques de désensibilisation très différentes (très rapide chez $\alpha 7$, quasi absente chez $\alpha 4\beta 2$), ils peuvent être inhibés par la nicotine ($\alpha 9$ et $\alpha 9\alpha 10$), avoir une grande sélectivité pour le calcium ($\alpha 7$ et $\alpha 8$, voir (Role & Berg, 1996) pour revue), être insensibles à l' α -bungarotoxine (la sous-famille III) ou être activés par la choline ($\alpha 7$, $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 4\beta 4$, $\alpha 9$ et $\alpha 9\alpha 10$, pour revue voir (Pereira et al., 2002)).

Par ailleurs, une autre isoforme de la sous-unité $\alpha 7$ ($\alpha 7-2$) a récemment été identifiée dans le neurone autonome de rat (Severance et al., 2004). De plus, l'analyse complète des gènes de la famille des récepteurs nicotiniques a permis d'identifier des candidats pour 16 sous-unités α et 12 sous-unités non- α chez le poisson *Fugu rubripes* (Jones

et al., 2003) et pour 27 sous-unités chez *C.elegans* (Jones & Sattelle, 2004). Chez l'homme, 4 nouveaux gènes codant potentiellement pour des sous-unités 5HT₃ ont été identifiées dans la banque de donnée du génome humain (Karnovsky et al., 2003). A ce jour, aucune analyse complète des gènes de la famille des nAChRs n'a été reportée pour un organisme vertébré. La présence d'autres formes et isoformes pourrait donc encore accroître la diversité des nAChRs neuronaux.

La signification physiologique d'une telle diversité est encore discutée, mais il semble qu'elle soit nécessaire à l'adressage de certains types de sous unités dans des compartiments subcellulaires spécifiques et au moment voulu (Le Novère et al., 2002).

	1	5	10	14	20	25	30	35	40	45	50	55	58
alpha	SEHETRLVANLLEN--YNKVIRPVEHHTHFVDITVGLQLIQLISVDEVNQIVETNVRLRQ												
beta	SVMEDTLLSVLFET--YNPKVRPAQTVDGKVTVRVGLTTLNLLILNEKIEEMTTNVFLNL												
gamma	ENEEGRLEIKLLGD--YDKRIIPAKTLDHIIIDVTLKLTLTNLISLNEKEEALTTNVWIEI												
delta	VNEEERLINDLLIVNKYNKHVRPVKHNNEVVNIALSLTSLNLSLKETDETSLTSNVMDH												
	* * . * * * . * * . * * . * * . * * .												
	59	65	70	75	80	85	90	95	100	105	110	118	
alpha	QWIDVRLRWNPAADYGGIKKIRLPSSDDVWLPDLVLNNADGDFAIVHMTKLLLDYTGKIMW												
beta	AWTDYRLQWDPAAYEGIKDLRIPSSDVWQPDIVLMNNNDGSFEITLHVNVLVQHTGAVSW												
gamma	QWNDYRLSWNTSEYEGIDLVRIPSELLWLPDVLENNVDGQFEVAYYANVLYNDGSMYW												
delta	AWYDHRLTNASEYSDISILRLPPELVIPDIVLQNNNDGQYHVAYFCNVLVRPNGYVTW												
	* * * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * .												
	119	125	130	135	140	145	150	155	160	165	166		
alpha	TPPAIFKSYCEIIVTHFPFDQNCMTKLGIVTDGTVKSISPESDRP-----D												
beta	QPSAIYRSSCTIKVMYFPFDWQNCMTVMFKSYTYDTSEVTLQHALDAKGER--EVKEIVIN												
gamma	LPPAIYRSTCPIAVTYFPFDWQNCSLVFRSQTYNAAHEVNLQLSAEEG--E--AVEWHID												
delta	LPPAIFRSSCPINVLYFPFDWQNCSLKFTALNYDANEITMDLMTDITDGKDYPIEWIID												
	* * * . * * * * * * * * * * . *												
	167	175	180	185	190	195	200	205	210	215	220	226	
alpha	LSTFMESGEWVMKDYRGWKHWVYTCPCPDTPYLDITYHFIMQRIPLYFVVNVIIIPCLLFS												
beta	KDAFTENGQWSIEHKPSRKNNWR---SD-DPSYEDVTFYLLIQRKPLFYIVYTIIPCLILS												
gamma	PEDFTENGEWIRHRPAKKNNYWLTKDDTDFQEIIFLLIQRKPLFYIINIAPCVLIS												
delta	PEAFTENGWEIIHKPAKKNIYPDKFPNGTNYQDVTFYLIIRRKPLFYVINFITPCVLIS												
	* * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * .												
	227	235	240	245	250	255	260	265	270	275	280	285	
alpha	FLTGLVFYLPDTS--EKMTLSISVLLSLTVFLLVIVELIPSTSSAVPLIGKYLFTMIFV												
beta	ILAILVFYLPDAG--EKMSLSISALLAVTVFLLLLADKVPETSLSVPIIRYLMFIMILV												
gamma	SLVVLVYFLPAQAGGQKCTLSISVLLAQTIIFLFLIAQKVPETSLNVPLIGKYLIFVMFVS												
delta	FLASLAFYLPAESG--EKMSTAISVLLAQAVFLLLSQRLPETALAVPLIGKYLFMISLV												
	* * * . * * . * * . * * . * * . * * . * * .												
	286	290	295	300	305	310	315	320	325				
alpha	ISSIIITVVVINTHHRSPSTHTMPQWVRKIFIDTIPNVMFFS-----												
beta	AFSVILSVVVLNLHHRSPNTHTMPNWIQIFETLPPFLWIQRVPTTSP---DS----												
gamma	MLIVMNCVIVLNVSLRTPNTHLSSEKIKHLFLGFLPKYLGMLQLEPSEETP---EKQPRR												
delta	TGVIVNCGIVLNFHFRTPSTHVLSTRVKQIFLEKLPRILHMSRADESEQPDWQNDLKLRR												
	 * . * . * * *												
	328	335	340	345	350	355	360					365	370
alpha	---TMKRASKEKQENKIFADDIDISDIS---GKQVTGEVIF-----QTPLIKNP												
beta	-KPTIISRANDEYFIRKPAGDFVCPVDNA---RVAVQPERLFSEMKNHNLGTQPVTLQP												
gamma	RSSFGIMIKAEYILKKPRSELMFEEQKDRHGLKRVNKMSTSIDIGTTVDLYKDLANFAP												
delta	SSSVGYISKAQEYFNIKSRSELMFEKQSER--HGLVPRVTPRIGFGNNENIAASDQLHD												
	* * . * * . * * . * * . * * . * * .												
	371	375	380	385	390	395	400	405	410	415	420	425	430
alpha	DVKSAIEGVKYLAEHMKSDDESSNAEEWKYVAMVIDHILLCVFMLICIIIGTVSVFAGRL												
beta	DLKEAVEAIKYIAEQLESASEFDDLLKKDWQYVAMVADRLFLYVFFVICSIGTFSIFLDAS												
gamma	EIKSCVEACNFIKSTKEQNDSGSENNWVLIGKVIDKACFWIALLLSIGTLAIFLTGH												
delta	EIKSGIDSTNYIVKQIEKNAYDEEVGNWNLVGQTIDRLSMFIITPVMVLGTIFIFVMGN												
	.. * .. * . * . * . * . * . * . * .												
	431	437											
alpha	IELSQEG-----												
beta	HNVPPDNPFA-----												
gamma	FNQVPEFPFGDPRKYVP-----												
delta	FNHPPAKPFEGDPFDYSSDHPRA												

(*) Identité (.) Homologie ■ : Segment transmembranaire (M1-M4)
En gras : pont disulfure Cys-128/Cys-142

Figure 2-4. Alignement des séquences des sous-unités α , β , γ et δ de *Torpedo californica*. L'alignement a été réalisé à l'aide du logiciel CLUSTAL W (1.60) à partir des séquences trouvées dans la banque de données SwissProt. Les séquences du peptide signal de chaque sous-unité ne sont pas représentées. La numérotation est basée sur la sous-unité α . Les résidus identifiés par marquage d'affinité, de photoaffinité et par mutagenèse dirigée, impliqués dans le site de liaison de l'ACh, sont représentés en rouge (sous-unité α) et en bleu (sous-unités γ et δ).

III) Structure du nAChR

Les premières structures primaires des nAChRs ont été établies au début des années quatre-vingt et ont initié un nombre incalculable d'expériences dont le défi était d'établir la topologie, l'arrangement des sous-unités, puis les structures secondaire et tertiaire des protomères. L'ensemble des connaissances actuelles est résumé ici.

A) Topologie des nAChRs

La topologie du récepteur nicotinique et des membres de la famille à boucle cystéine sont largement déduites de leur homologue des tissus électriques de *Torpedo*.

Ce récepteur est une glycoprotéine membranaire de masse molaire environ égale à 290 kDa, et dont 20 kDa proviennent des résidus d'oligosaccharides. Elle est composée de quatre sous-unités différentes assemblées en un pentamère hétérologue de stoechiométrie $\alpha_2\beta\gamma\delta$. Chez la torpille, deux monomères sont reliés entre eux par un pont disulfure intermoléculaire entre les cystéines C-terminales des sous-unités δ . Ces quatre sous-unités ont une masse molaire apparente sur gel SDS-PAGE de 40 kDa, 48 kDa, 60 kDa et 65 kDa, respectivement.

Suite aux clonages de ces quatre sous-unités au début des années quatre-vingt, on a pu constater qu'elles sont composées de 437 (α), 469 (β), 489 (γ) et 501 (δ) résidus (**Figure 2-4**). De plus, l'analyse des structures primaires permet de voir qu'elles partagent entre elles, ainsi qu'avec le reste des récepteurs à boucle cystéine, un certain nombre de caractéristiques communes :

- il existe une forte identité de séquence entre les sous-unités d'une même espèce (entre 36 et 72 % chez l'humain) et entre les mêmes sous-unités de différentes espèces (80% entre α de *Torpedo* et α humaine par exemple).
- les profils d'hydropathie laissent suggérer une architecture commune : un long segment N-terminal hydrophile (~200 résidus, contenant un ou plusieurs sites de glycosylation) suivi d'une région hydrophobe compacte (~70 résidus, subdivisée en 3 segments d'une vingtaine de résidus), elle-même suivie d'une seconde région hydrophile très variable (100 à 150 résidus) et enfin un quatrième segment hydrophobe (~ 20 résidus).

- Une boucle extrêmement conservée de 15 résidus, insérée entre deux cystéines (C128 et C142 chez la sous-unité α de *T.californica*) formant un pont disulfure, et localisée dans le premier domaine hydrophile, a donné son nom à la famille des récepteurs à boucle cystéine.

Au vu des ces profils d'hydropathie, plusieurs modèles de repliement topologique et d'insertion dans la membrane ont été proposés. Le modèle consensus (Devillers-Thiery et al., 1983; Noda et al., 1983; Popot & Changeux, 1984), supporté par de nombreuses expériences (McCrea et al., 1987; DiPaola et al., 1989), est illustré dans la **Figure 2-5**. Chaque sous-unité est composée d'un grand domaine extracellulaire, suivi de trois segments transmembranaires (M1 – M3) connectés entre eux par des petites boucles, d'un domaine intracytoplasmique assez variable contenant des sites de phosphorylation intracellulaires, et d'un quatrième segment transmembranaire (M4) qui oriente l'extrémité C-terminale vers la fente synaptique.

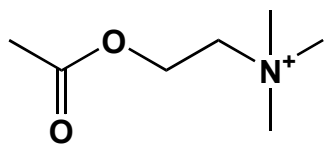
Les sous-unités s'auto-assemblent en pentamères autour d'un canal ionique central. On sait maintenant, depuis la publication de la structure de l'AChBP³ (Brejc et al., 2001), que l'ordre relatif des sous-unités est $\alpha\gamma\alpha\delta\beta$, dans le sens inverse des aiguilles d'une montre en regardant depuis la fente synaptique.

B) Sites de liaison du nAChR

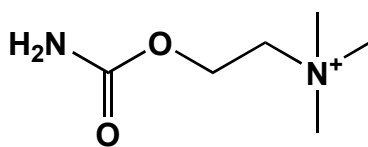
Des études électrophysiologiques et des expériences de liaison ont permis de distinguer pour ce récepteur plusieurs sites pharmacologiques distincts. Les études structurales, la mutagenèse et les marquages chimiques dirigés ont permis d'affiner la position de ces sites. On peut citer :

- **Sites agoniste (ou sites ACh)** : ces sites sont capables de lier des agonistes et des antagonistes compétitifs. Ils se trouvent dans la partie N-terminale synaptique du récepteur à l'interface de deux sous-unités : une sous-unité principale (α) et une sous-unité complémentaire (γ , δ ou ε pour les nAChRs musculaires, α ou β pour les nAChRs

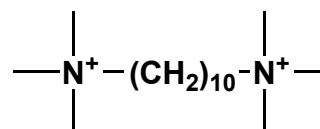
³ L'AChBP est une protéine soluble homologue à la partie N-terminale extracellulaire du nAChR. Elle est décrite plus en détail dans la partie III-F de ce chapitre (p 30).



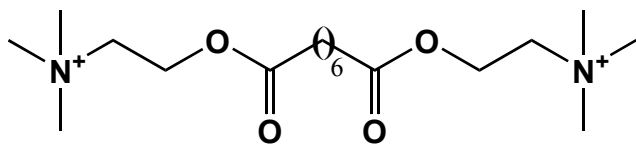
Acétylcholine



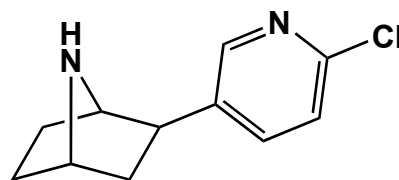
Carbamylcholine



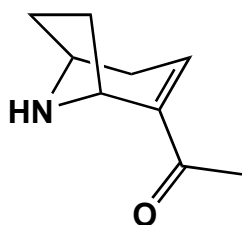
Décaméthonium



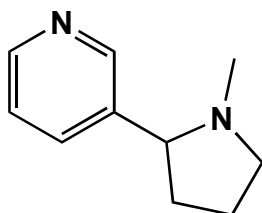
Suberyldicholine



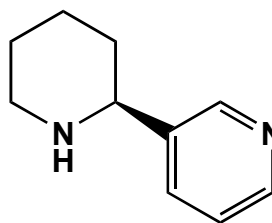
Epibatidine



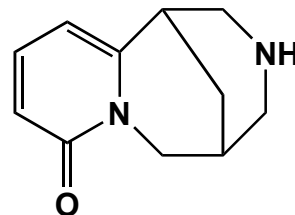
(+)- Anatoxine - a



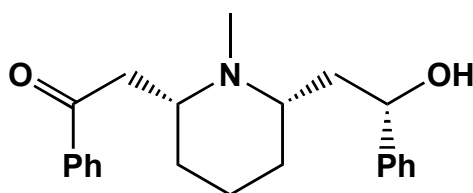
Nicotine



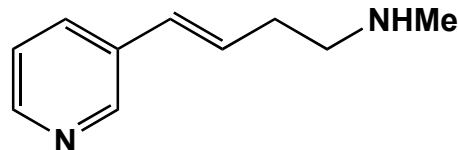
Anabasine



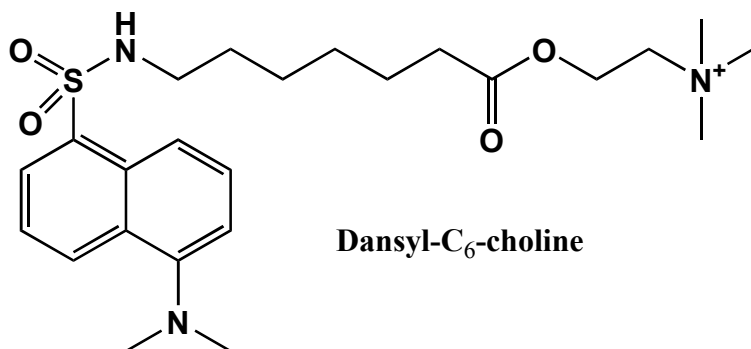
Cytisine



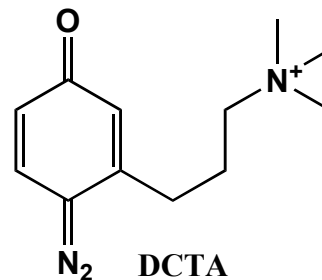
Lobeline



RJR 2403



Dansyl-C₆-choline



DCTA

Figure 2-6 : Structures de quelques agonistes. L'ACh est le neurotransmetteur endogène. Les autres molécules sont soit:

- des alcaloïdes naturels: l'épibatidine est isolée de la peau de la grenouille *Epipedobates tricolor*, l'anatoxine-a des cyanobactéries, la nicotine et l'anabasine du tabac, la cytosine des graines de l'aubour, la lobeline de l'herbe et des graines du tabac indien Lobelia.

- des molécules de synthèse : la CCh, le décaméthonium et la suberyldicholine sont des outils pharmacologiques, le RJR 2403 est développé dans un but thérapeutique, la dansylcholine est un agoniste fluorescent et le DCTA un agoniste photosensible.

neuronaux)⁴. On dénombre soit deux (nAChRs type musculaire et type neuronal III) soit cinq (nAChRs type neuronal I et II) sites agonistes par récepteur. L'agoniste endogène est l'acétylcholine (ACh), mais de nombreuses molécules de structures très différentes (nicotine, épibatidine, curare...) se lient aussi au site ACh (voir **Figures 2-6** et **2-7** pour quelques structures d'agonistes et d'antagonistes compétitifs).

- **Sites des bloquants non compétitifs (BNCs) du canal** : on distingue deux types de sites structurellement différents : un site de haute affinité (K_d de l'ordre du micromolaire) et de nombreux sites (de 10 à 30) de basse affinité (K_d de l'ordre de la centaine de micromolaires). Le premier est localisé dans le canal⁵ (un seul site par nAChR) et la fixation des BNCs inhibe le récepteur en bloquant le passage des ions de manière stérique. Les autres sites de basse affinité⁶ sont localisés à l'interface lipide-protéine et bloquent le canal de manière allostérique. La structure de quelques BNCs est représentée dans la **Figure 2-8**. Plusieurs des ces BNCs bloquent aussi le canal du récepteur NMDA (Albuquerque et al., 1991), suggérant un principe d'architecture fonctionnelle similaire pour ces deux membres de la famille des récepteurs canaux.

- **Site(s) agoniste non compétitif** : L'ésérine (ou physostigmine) est un inhibiteur de l'AChE qui se fixe sur le nAChR et qui induit des courants ioniques (Shaw et al., 1985). Cependant, étant donné que ces courants ne sont pas inhibés par les antagonistes compétitifs dTC et α -BgTx, mais par l'anticorps monoclonal FK1, l'ésérine doit se fixer dans un site distinct du site agoniste (Okonjo et al., 1991). Étonnamment, elle serait même capable d'induire des courants sur le récepteur désensibilisé (Kuhlmann et al., 1991). D'autres ligands (la benzoquinonium, la galanthamine et la codéine, voir **Figure 2-9**) semblent avoir les mêmes propriétés (Pereira et al., 1993; Storch et al., 1995). Il y aurait 2 sites par récepteur, localisés dans la partie N-terminale extracellulaire du nAChR, l' α K125 de *Torpedo Californica* ayant été identifiée par marquage de photoaffinité comme appartenant au site ésérine (Schrattenholz et al., 1993). À plus forte concentration ($\geq 10 \mu\text{M}$), ces ligands inhibent le nAChR en agissant aussi comme BNCs (Zwart et al., 2000), pour revue voir (Pereira et al., 2002). Il semble également possible que la sérotonine puisse se fixer à ce site

⁴ La structure plus précise de ce site est décrite dans la partie III-G de ce chapitre (p 34).

⁵ La structure plus précise de ce site est décrite dans la partie III-D de ce chapitre (p 19)

⁶ La structure plus précise de ce site est décrite dans la partie III-D de ce chapitre (p 23)

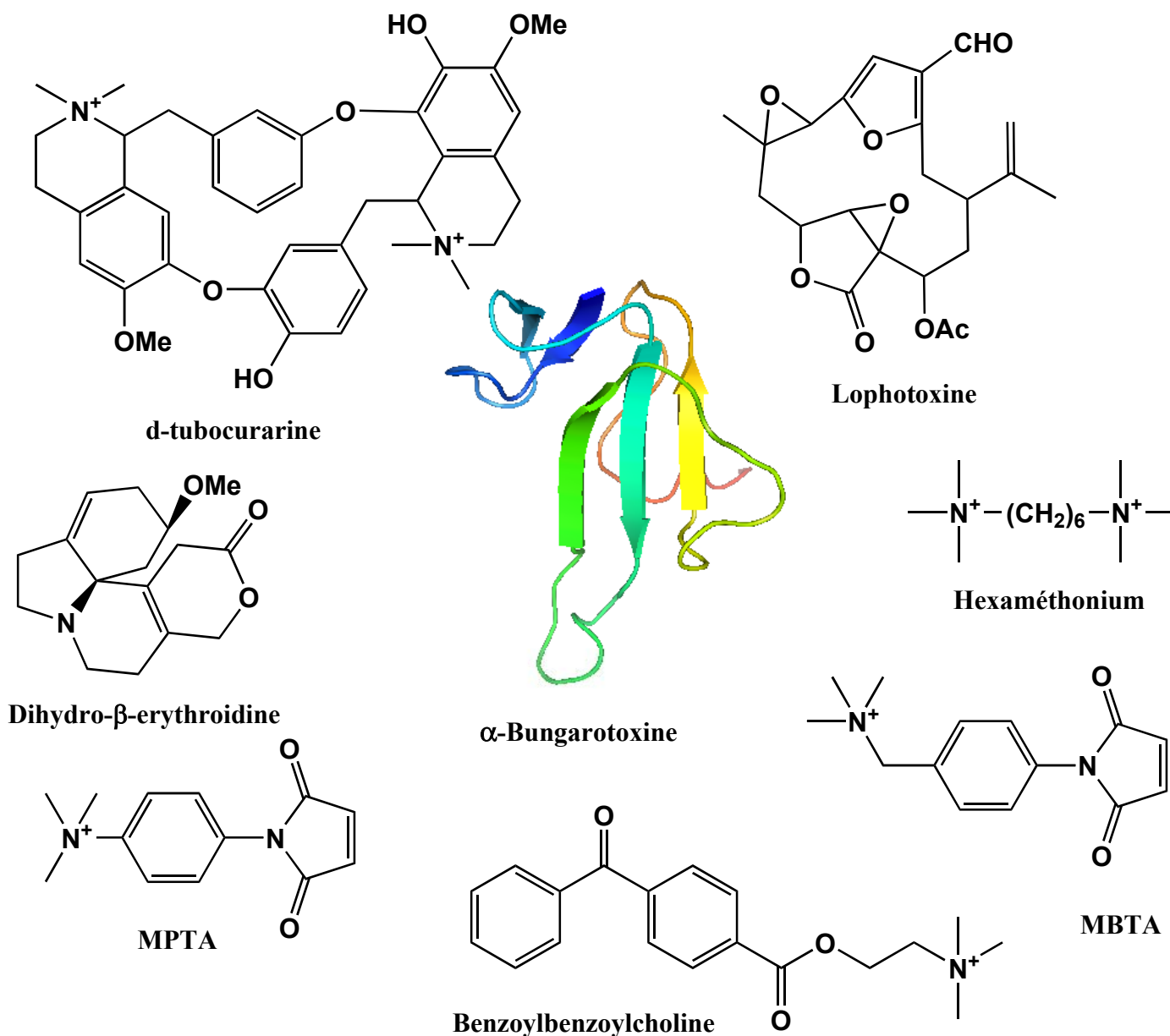


Figure 2-7 : Structure de quelques antagonistes compétitifs. Ces différents molécules sont soit:

-des alcaloïdes: la d-tubocurarine (curare) est un alcaloïde tiré d'une liane amazonienne, et utilisé par les indiens pour paralyser leurs proies; la dihydro-β-erythroidine est isolée des graines de l'arbre à corail (*Erythrina sp. leguminosae*)

-des toxines: la lophotoxine de corail, l'α-bungarotoxine de venin de serpent (peptide coloré ici du bleu au rouge du N-terminal au C-terminal, et dont les brins β sont représentés par des flèches; image réalisée avec iMol).

-des outils pharmacologiques (hexaméthonium) utilisés pour les couplages chimiques (MPTA, MBTA) et photochimiques (benzoylbenzoylcholine).

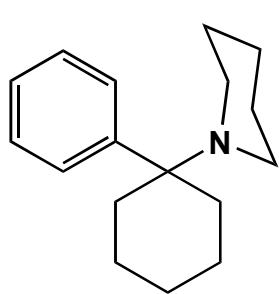
agoniste non compétitif, pour réguler ainsi de manière endogène le nAChR (Schrattenholz et al., 1996).

- **Sites du calcium** : il a été montré par expériences photométriques de titration du calcium que le nAChR avait une grande capacité de liaison des ions calcium : jusqu'à 45 ions par récepteur (Chang & Neumann, 1976). Les ions calcium potentialisent la réponse physiologique des nAChRs neuronaux en augmentant l'amplitude des courants ioniques, l'affinité apparente des agonistes et la coopérativité (Mulle et al., 1992; Vernino et al., 1992). Plusieurs sites du calcium ont été identifiés au niveau des résidus $\alpha 7$ E18, E44 et dans la région 161-172 par mutagenèse dirigée (Galzi et al., 1996). Seule cette dernière région, proche du site agoniste, affecte la potentialisation du calcium. Dans une récente modélisation moléculaire, deux autres résidus (D43 et D41) sont à proximité de E172 et pourraient complexer un ion calcium (Le Novère et al., 2002).

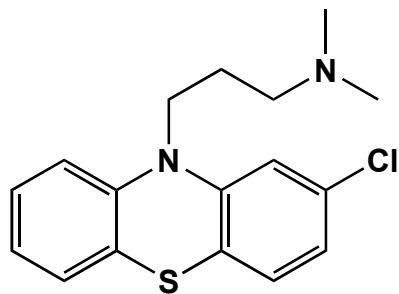
- **Site(s) du zinc** : les ions Zn^{2+} sont capables de moduler l'activité des nAChRs (Hsiao et al., 2001), mais aussi de tous les récepteurs canaux à boucle cystéine (Gill et al., 1995; Hosie et al., 2003; Nevin et al., 2003). Ils pourraient même moduler l'activité basale des nAChRs sans ligand (Tonini et al., 2004). La position du(des) site(s) du zinc reste à déterminer.

- **Site ivermectine** : l'ivermectine (structure **Figure 2-10**) potentialise les courants induits par l'ACh sur le nAChR $\alpha 7$ (Krause et al., 1998). L'augmentation concomitante de l'affinité apparente et de la coopérativité de la courbe dose-réponse permet de penser que l'ivermectine joue un rôle d'effecteur allostérique positif du nAChR. Il est supposé que l'ivermectine se lie à un site spécifique distinct du site agoniste et du site calcium, qui pourrait se chevaucher avec le site des stéroïdes.

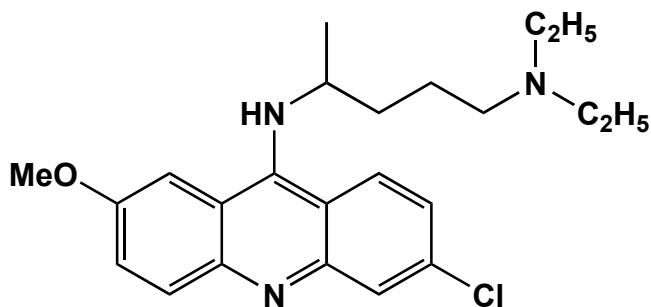
- **Site des stéroïdes** : les stéroïdes sont connus pour inhiber les nAChRs neuronaux (Valera et al., 1992) et musculaires (Bouzat & Barrantes, 1996). Etant donné que l'inhibition de la progestérone (structure **Figure 2-10**) ne nécessite pas la présence d'agoniste, n'est pas dépendante du voltage et n'altère pas la désensibilisation du récepteur, les stéroïdes ne semblent pas être des bloquants du canal ouvert (Valera et al., 1992) mais se fixeraient plutôt à l'interface lipide-protéine (Bouzat & Barrantes, 1996). Récemment, l' $\alpha H408$,



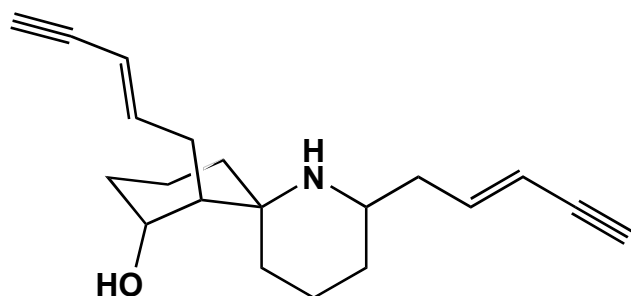
Phencyclidine (PCP)



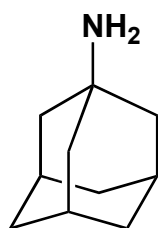
Chlorpromazine



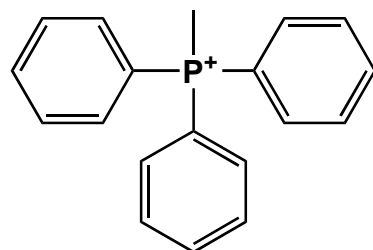
Quinacrine



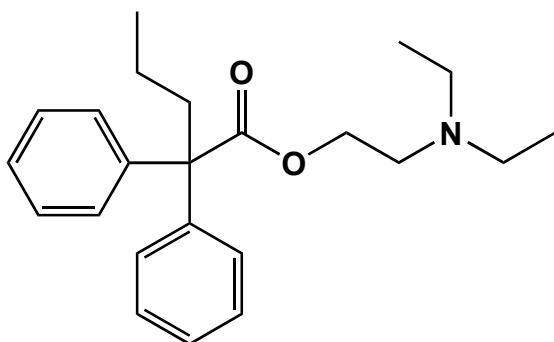
Histrionicotoxine



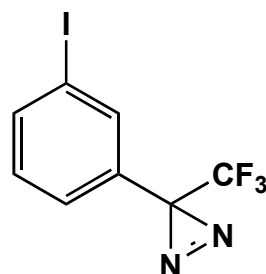
Amantadine



Triphénylméthylphosphonium



Proadifène



TID

Figure 2-8: Structure de quelques bloqueurs non-compétitifs du canal (BNCs). Ces différentes molécules sont soit:

- des produits de synthèse chimique à visée thérapeutique: la phencyclidine ou PCP ou encore « Angel dust » est un hallucinogène utilisé autrefois comme anesthésique, puis devenue drogue populaire; la chlorpromazine est un neuroleptique développé par Rhone Poulenc; la quinacrine, nom commercial Atabrine, est utilisée pour le traitement de la malaria et de certains vers parasites; l'amantadine est utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson.

- des toxines alcaloïdes : l'histrionicotoxine est isolée de la peau d'une grenouille (*Dendrobates histrionicus*).

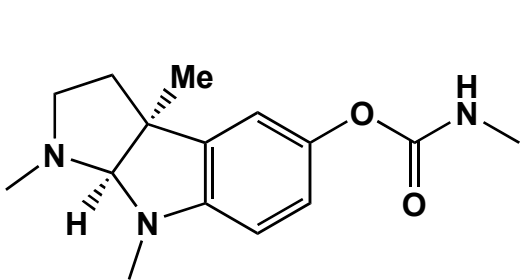
- des outils pharmacologiques : le proadifène est un agent couramment utilisé pour désensibiliser le récepteur. Le triméthylphénylphosphonium et le TID sont des marqueurs de photoaffinité.

l' α C412, l' α C418, la β Y441, la β C447, la γ C451, la γ W453 et l' α T422 du domaine transmembranaire M4 de *Torpedo* ont été identifiés par photomarquage et mutagenèse dirigée comme appartenant au site des stéroïdes (Blanton et al., 1999; Garbus et al., 2002). Par ailleurs, l'hormone stéroïdienne estradiol semble capable de potentialiser le nAChR α 4 β 2 en se fixant spécifiquement sur la sous-unité α 4 (Curtis et al., 2002).

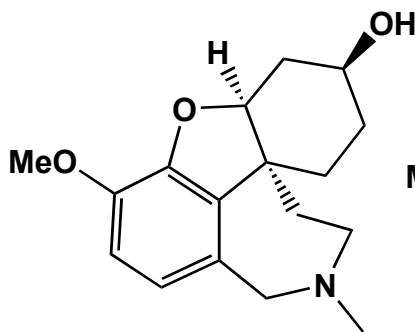
- **Site de l'ATP** : L'ATP (structure **Figure 2-10**) est capable d'exercer une action agoniste sur les nAChRs musculaires exprimés dans l'ovocyte de xénope (Igusa, 1988) ou sur les fibres de muscles de rat en culture (Mozrzymas & Ruzzier, 1992). En addition de son action agoniste, l'ATP module la sensibilité des agonistes : des concentrations micromolaires d'ATP produisent une augmentation de 2 à 3 fois de l'activité du nAChR induite par 0,1 nM d'ACh (Igusa, 1988). Le site de liaison a été identifié par marquage de photoaffinité dans la région extracellulaire (L11-P17 et D152-H163) de la sous-unité β de *Torpedo* (Schrattenholz et al., 1997).

- **Site(s) des polyamines** : La Philanthotoxine-433 est une toxine neuroactive composée d'une tête hydrophobe et d'une queue polyaminée, présente dans le venin de guêpe, et qui antagonise de manière non-compétitive le nAChR (Rozental et al., 1989), probablement en inhibant de manière stérique le flux cationique (Hsu, 1994). Cependant, il a été rapporté que les polyamines (voir structure de la spermine **Figure 2-10**) pouvaient aussi potentialiser la réponse à l'ACh des nAChRs musculaires. L'action des polyamines semble donc multiple, et il existerait au moins quatre sites de liaison (Shao et al., 1998). Des dérivés photosensibles ont permis de localiser un site de liaison dans le vestibule du canal ionique, la queue polyamine établissant des liaisons électrostatiques dans le canal, alors que la tête aromatique serait en contact avec l'entrée du canal (α H186- α L189), à proximité du site agoniste (Bixel et al., 2001). Il faut cependant noter qu'à pH physiologique, les polyamines sont fortement chargées positivement, et interagissent donc potentiellement avec toutes les surfaces chargées négativement.

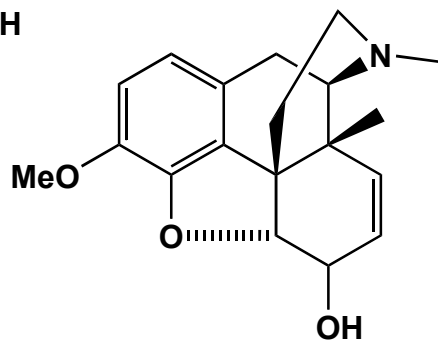
- **Site amyloïde- β** : Il a été rapporté récemment que l'amyloïde- β ₁₋₄₂ ($A\beta$ ₁₋₄₂), un peptide de 42 résidus impliqué dans la maladie d'Alzheimer, se liait avec très haute affinité (0,2 pM et 5 nM) sur le nAChR α 7 (Wang et al., 2000). Cette première étude montre que la liaison de $A\beta$ ₁₋₄₂ est inhibée par la nicotine et l'épipatidine, concluant ainsi à une



Physostigmine (ésérine)



Galanthamine



Codéine

Figure 2-9: Structure de quelques agonistes non-compétitifs.

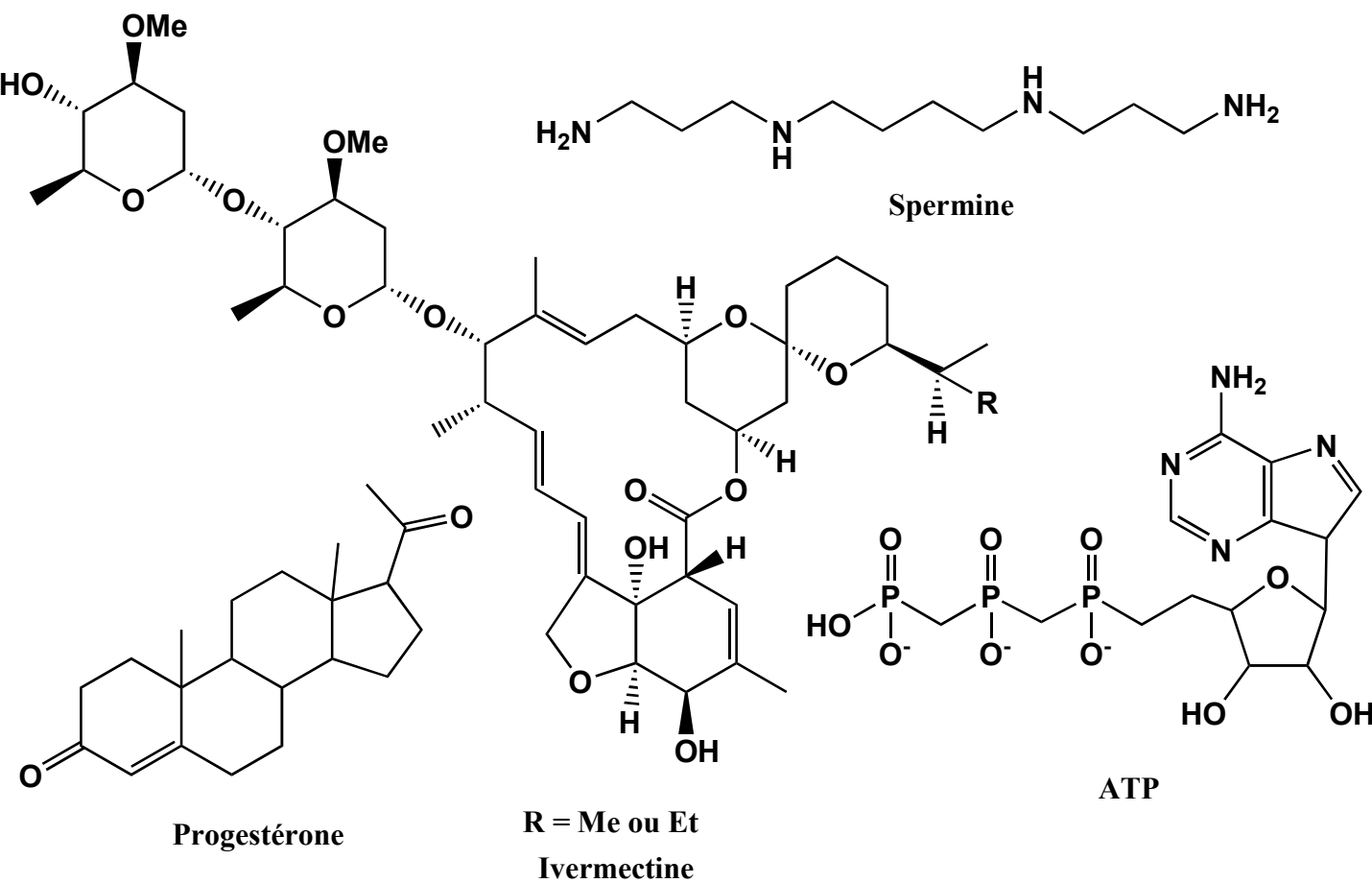


Figure 2-10: structure de quelques modulateurs allostériques du nAChR.

liaison dans le site agoniste. $A\beta_{1-42}$ se lierait aussi sur $\alpha 4\beta 2$ mais avec une affinité 5000 plus faible (Wang et al., 2000) et sur les nAChRs musculaires (Grassi et al., 2003). Des études ultérieures de mesure de courant sur cellules entières ont montré, de manière contradictoire, que $A\beta_{1-42}$ inhibe de manière non-compétitive le nAChR $\alpha 7$ (Liu et al., 2001; Grassi et al., 2003). De manière surprenante, d'autres études ont ensuite montré que $A\beta_{1-42}$ était capable d'activer le nAChR $\alpha 7$ à des concentrations comprises entre 1 et 100 pM (Dineley et al., 2002; Dougherty et al., 2003), mais aussi des nAChRs non- $\alpha 7$ (Fu & Jhamandas, 2003). Une modélisation récente positionne l' $A\beta_{1-42}$ en contact avec la boucle C du site agoniste (Espinoza-Fonseca, 2004). Par ailleurs, nous n'avons mesuré aucune inhibition de la liaison de l' α -BgTx par l' $A\beta_{1-42}$ sur le nAChR de *Torpedo marmorata* (données non publiées).

- **Site de l'acide kynurénique (KYNA)** : le KYNA est un métabolite du cycle de synthèse du tryptophane. Il inhibe les nAChRs $\alpha 7$ de manière non-compétitive, les coefficients de Hill très faibles suggérant une coopérativité négative entre le site agoniste et le site KYNA. Les expériences menées à l'aide de la chimère $\alpha 7$ nAChR-5HT₃ tendent à montrer que le KYNA interagit directement avec le nAChR et que son site est localisé dans le domaine N-terminal extracellulaire (pour revue voir (Pereira et al., 2002)).

- **Site albumine?** : Il a été montré récemment que l'albumine sérique bovine (BSA) potentialise l'effet agoniste sur les nAChRs de manière rapide, réversible et dépendante de la concentration (Butt et al., 2002). Certaines albumines augmentent la probabilité d'ouverture des nAChRs $\alpha 7$ (Conroy et al., 2003) en augmentant l'affinité des agonistes et l'amplitude de la réponse maximale. Il reste à déterminer si les albumines interagissent directement avec les nAChRs ou non.

- **Site des neuropeptides?** : Le polypeptide intestinal vasoactif (VIP) et les polypeptides PACAP sont eux aussi capables de potentialiser les courants induits par l'ACh sur le nAChR en augmentant l'affinité des agonistes (Margiotta & Pardi, 1995). L'effet des ces peptides semble cependant indirect, mettant en jeu une cascade de signaux de transductions faisant intervenir une protéine G (Liu et al., 2000). La substance P est capable de potentialiser la liaison de l'ACh (Min & Weiland, 1993) et d'inhiber les nAChRs musculaires (Min et al., 1994) et neuronaux (Simasko et al., 1987). Des interactions entre la substance P et les sous-unités delta et gamma ont pu être mises en évidence par des

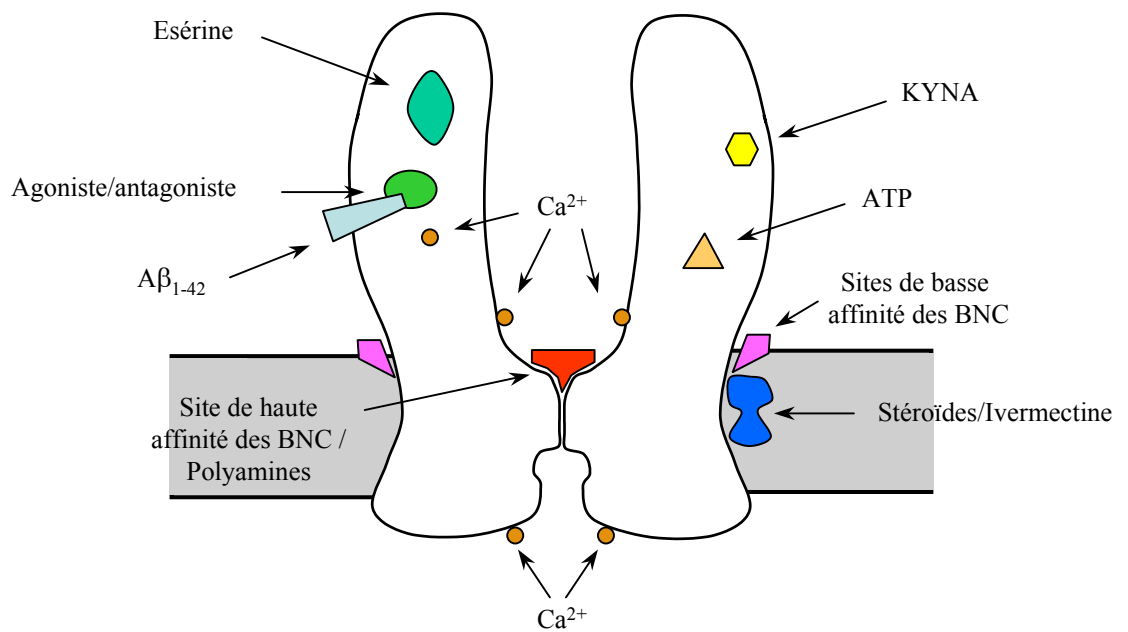


Figure 2-11. Récapitulatif des différents sites pharmacologiques du récepteur nACh. Les différents sites sont représentés sur un modèle de récepteur consensuel.

expériences de cross-link (Min et al., 1994), et plus précisément au niveau de $\delta M2$ par marquage de photoaffinité (Blanton et al., 1994), indiquant que le site de liaison de la substance P serait dans le canal. Par ailleurs il semble que l'affinité de la substance P sur les nAChRs neuronaux soit liée aux sous-unités β (Stafford et al., 1994). D'autres peptides tels l'hormone thymique thymopoiétine, la calcitonine et le neuropeptide Y semblent aussi moduler l'activité des nAChRs, pour revue voir (Arias, 1998).

- **Site de l'hormone Prostaglandine E2 (PGE2)?**: des concentrations nanomolaires de PGE2 sont capables d'augmenter la probabilité d'ouverture, la fréquence et la durée d'ouverture de nAChRs somatodendritiques (Du & Role, 2001). Leur mode d'action reste à élucider.

- **D'autres sites** : L'inventaire de substances modulant l'action des nAChRs augmente continuellement, que ce soit des substances endogènes ou exogènes. Il paraît raisonnable de penser qu'il existe encore de nombreux sites pharmacologiques non identifiés sur les nAChRs. L'existence de ces sites n'implique pas forcément la présence d'un ligand endogène. Un résumé des sites identifiés sur le nAChR est représenté **Figure 2-11**.

C) Structure du nAChR de torpille obtenue par M.E. :

Les membranes isolées des organes électriques de torpille ont une tendance naturelle à s'organiser en cristaux bidimensionnels sur une surface hélicoïdale formant des tubes. L'arrangement des récepteurs dans ces cristaux est très proche de celui observé *in vivo*. Ces tubes peuvent être observés par microscopie électronique à basse température (4° K) afin de donner des informations structurales sur le nAChR (Unwin, 2003). Il a été possible notamment d'étendre les analyses à une résolution de 4,6 Å (Miyazawa et al., 1999) sur le récepteur dans sa totalité et à 4 Å sur le domaine transmembranaire (Miyazawa et al., 2003). Ces résolutions ont pu être atteintes en utilisant une source d'émission d'électrons à haut voltage, en gardant les échantillons à très basse température, et en analysant le signal de plusieurs milliers de récepteurs afin d'augmenter le rapport signal / bruit (environ 50 000 récepteurs pour la résolution de 4,6 Å, deux fois plus pour 4 Å). Les cristaux nécessitent donc une très grande exactitude dans leur alignement, et des calculs de déformation de la maille du cristal sont nécessaires pour corriger les erreurs (Unwin, 2003).

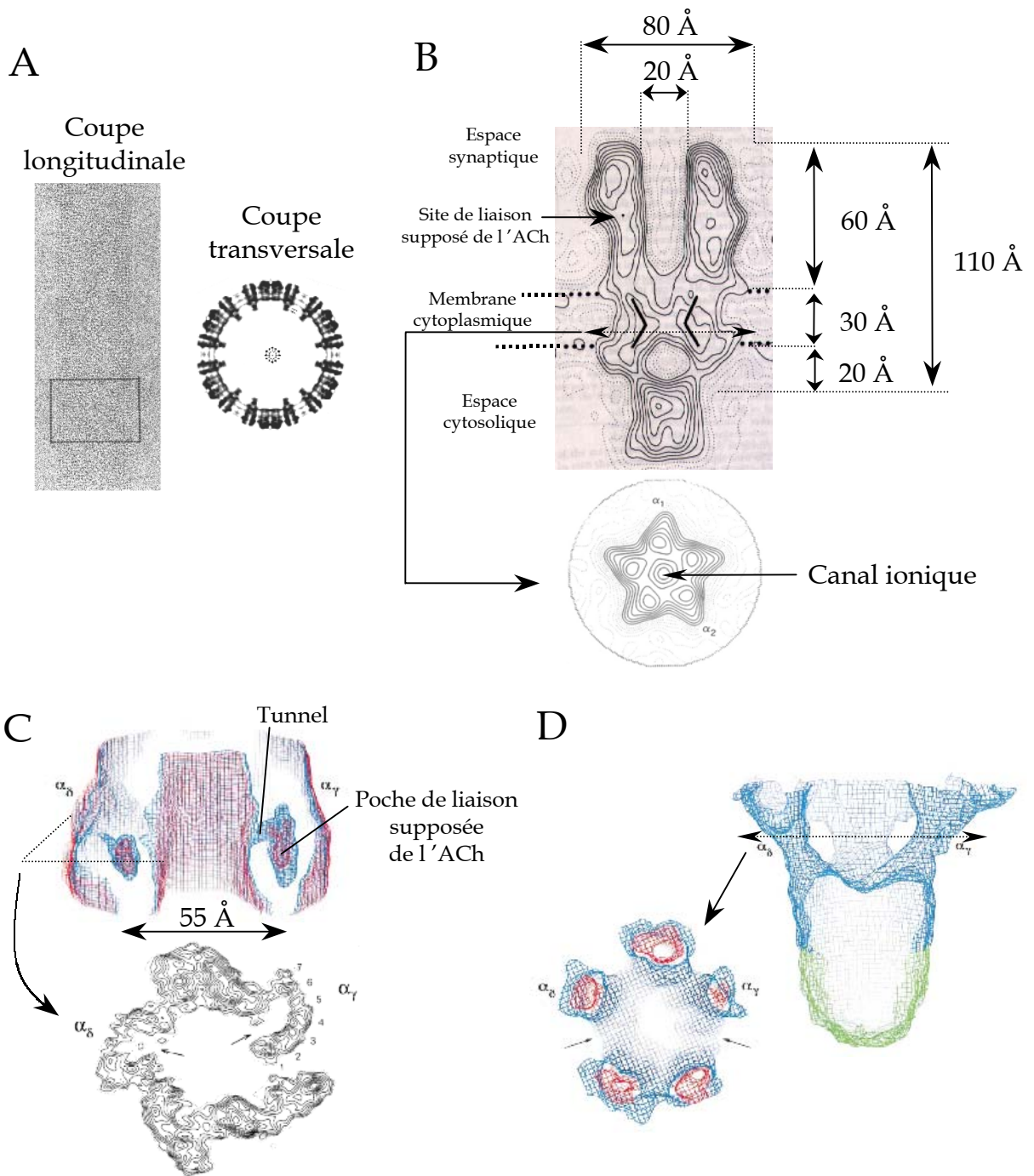


Figure 2-12: Images du récepteur nACh par microscopie électronique. (A) Image longitudinale et transversale d'un tube hélicoïdal de torpille. (B) Cartes de densités électroniques à 9 Å de résolution du récepteur avec ses dimensions. Une coupe transversale dans la membrane est représentée en bas. (C) Détail à 4,5 Å de résolution du site de liaison supposé de l'ACh localisé à 30 Å au dessus de la membrane. Une coupe transversale (en bas) permet de distinguer des éléments de structure secondaire. (D) Domaine cytoplasmique du récepteur (en bleu) associé à la rapsyn (en vert). Une coupe dans le domaine cytoplasmique du récepteur fait apparaître des cylindres (en rouge) de 30 Å de long délimitant des ouvertures (flèches). Les sous-unités α_δ et α_γ se réfèrent aux sous-unités α accolées respectivement aux sous-unités δ et γ (d'après Unwin, 1993 ; Miyazawa et al., 1999).

- Structure générale du nAChR de torpille

La structure pentamérique du nAChR de torpille a été mise en évidence par des études de microscopie électronique (Unwin, 1993). Les images obtenues à 9 Å de résolution, représentées en **Figure 2-12**, montrent déjà clairement que le nAChR forme un complexe pentamérique. Chaque récepteur apparaît en coupe transversale sous la forme d'une rosette de 80 Å de diamètre comportant cinq zones de densité électronique organisées selon un axe de pseudo-symétrie d'ordre 5, autour d'une cavité centrale. En coupe longitudinale, le récepteur mesure 110 Å de long et traverse la membrane sur une longueur de 30 Å. Le domaine synaptique s'étend sur 60 Å tandis que la région cytosolique ne mesure que 20 Å. L'entrée extracellulaire du pore mesure 25 Å alors que l'entrée intracellulaire est plus rétrécie.

L'arrangement relatif des sous-unités a été étudié à l'aide de réactifs spécifiques à chaque sous-unité. Bien que les positions des deux sous-unités α et δ semblent indiscutables, les auteurs plaçaient la sous-unité β entre les deux α (Kubalek et al., 1987) et ceci malgré le nombre important d'expériences localisant la sous-unité γ entre les deux α . Du fait que les sites ACh sont à l'interface $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$, les données structurales de M.E. ne pouvaient être expliquées que si les deux sites étaient orientés en sens contraire l'un par rapport à l'autre, hypothèse incompatible avec les considérations de symétrie du récepteur. On sait désormais, depuis la publication de la structure de l'AChBP (Brejc et al., 2001), que les sous-unités γ et β ont été interverties et que l'arrangement des sous-unités est de type $\alpha\gamma\alpha\delta\beta$.

- Structure du domaine synaptique

Les cartes de densité électronique à 9 Å de résolution laissent apparaître, à 30 Å au dessus de la membrane, deux cavités dans les sous-unités α supposées être les sites agonistes. Cette distance site agoniste - membrane est en accord avec celle estimée par FRET⁷, entre 31 et 39 Å, à l'aide de lipides fluorescents et de l'agoniste Dansyl-C₆-Choline (Valenzuela et al., 1994). Des différences entre ces cavités sont observées, en accord avec la non-équivalence pharmacologique des deux sites (Blount & Merlie, 1989). La distance

⁷ Le FRET (Fluorescence resonance energy transfert) est une technique qui permet d'évaluer la distance entre deux fluorophores de nature complémentaire. Le fluorophore donneur transfère son énergie au fluorophore accepteur en fonction de différents facteurs, dont en particulier la distance les séparant.

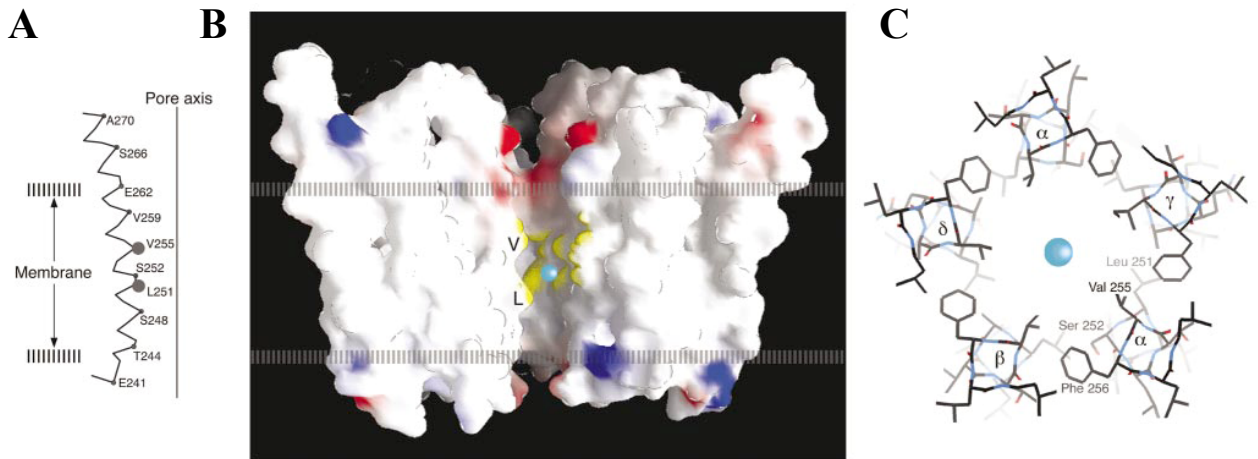


Figure 2-13: Structure du canal. (A) Le segment M2 traverse la membrane sous la forme d'une hélice α courbée. Les anneaux de valines et de leucines forment une constriction dans le canal, et sont supposés former la « porte » du canal. L'hélice sort de 10 Å de la membrane du côté synaptique. (B) Surface moléculaire du canal. Les zones rouges et bleues correspondent respectivement aux zones chargées négativement et positivement. Les zones jaunes mettent en évidence les régions hydrophobes des deux anneaux constituant la porte du canal. (C) Arrangement symétrique des chaînes latérales des résidus constituant la porte. La sphère bleue en (B) et (C) représente un ion sodium sans sa couche d'hydratation. D'après (Miyazawa et al., 2003).

séparant les deux cavités a été estimée à 42 Å, distance assez proche des 55 Å estimés à l'aide d' α -toxines de cobra marquées à la fluorescéine et à la rhodamine (Johnson et al., 1984). Par contre, le fait que ces sites soient situés au milieu des sous-unités alpha est en désaccord complet avec le marquage de photoaffinité (pour revue voir (Corringer et al., 2000)) et la récente structure cristallographique de l'AChBP (Brejc et al., 2001) qui montrent que les sites agonistes sont à l'interface $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$.

A 4,6 Å de résolution, les densités électroniques montrent des tunnels de 10 à 15 Å de longueur qui relient ces sites à la cavité centrale du récepteur. Ces tunnels permettraient à l'ACh d'atteindre son site (Miyazawa et al., 1999). Cette observation est également en désaccord avec la structure de l'AChBP (Brejc et al., 2001).

- Structure du domaine transmembranaire

A 9 Å de résolution, on observe 5 cylindres formant les parois du pore, vraisemblablement les segments transmembranaires M2 structurés en hélice α (Unwin, 1993).

A 4 Å de résolution, la structure de M2 est plus précise : les cinq M2 sont des hélices α de 40 Å de long, légèrement courbes au niveau de l' α P265 et à proximité de l' α L251 (**Figure 2-13**). Elles traversent la membrane avec des résidus homologues à chaque niveau, formant des anneaux tout au long du pore. La constriction maximale du canal se trouve au milieu de la membrane, dans une zone très symétrique (**Figure 2-13**) qui est supposée être la « porte » du canal. Deux anneaux de résidus hydrophobes (Anneaux Val et Leu) forment à cet endroit un pore de 3 Å de diamètre sur une longueur d'environ 8 Å, pore trop étroit pour laisser passer un ion sodium ou potassium possédant encore en partie sa couche d'hydratation. Or ces résidus ne peuvent pas, de par leur caractère apolaire, retirer les couches d'eau associées aux cations. Cette zone est donc une barrière énergétique empêchant le passage des ions (Miyazawa et al., 2003).

La structure de la région membranaire en contact avec les lipides (segments M1, M3 et M4) n'est pas bien résolue à 9 Å. Les auteurs suggèrent cependant, d'après l'apparence continue des densités électroniques, une structure en feuillets β entourant les hélices α M2 à la manière d'un tonneau β (Unwin, 1993). Ce modèle en feuillet β n'est pourtant pas en accord avec la plupart des expériences de photoaffinité et de SCAM qui

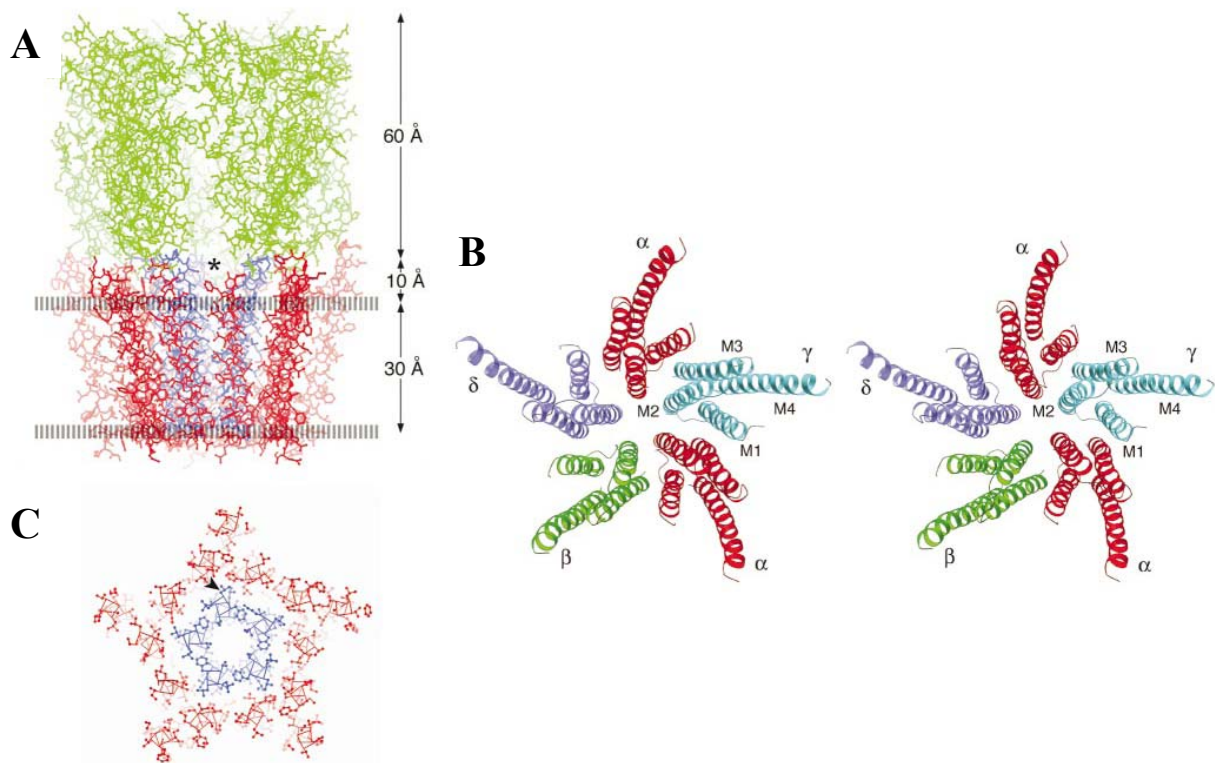


Figure 2-14: Structure pentamérique du domaine transmembranaire. (A) vue perpendiculaire à l'axe du récepteur, sur laquelle on peut voir les hélices M2 (en bleu), les hélices M1, M3 et M4 (en rouge) ainsi que le grand domaine extracellulaire de liaison des agonistes (en vert). Un espace vide entre les sous-unités est indiqué par un astérisque. La membrane est représentée par des tirets. (B) Structure du pore en vue stéréo depuis le côté synaptique. Chaque sous-unité est représentée d'une couleur différente. (C) Vue du canal en coupe transversale au milieu de la membrane. Les segments M2 formant les parois du canal sont représentés en bleu et les trois autres segments (M1, M3 et M4), en contact avec les lipides, sont représentés en rouge. La flèche pointe vers l' α L257, résidu probablement impliqué dans la liaison d'alcools et anesthésiques sur les récepteurs glycine et GABA_A. D'après (Miyazawa et al., 2003).

tendent à montrer une structure en hélice α pour ces trois segments⁸. Il faudra attendre 10 ans et la structure à 4 Å pour lever le doute sur la structure de ce domaine : cette résolution est suffisante pour visualiser la structure en hélice α des trois segments M1, M3 et M4 (**Figure 2-14**) (Miyazawa et al., 2003). Ce groupe d'hélices semble stabilisé dans la membrane par des interactions hydrophobes autour d'un résidu central (α F233 sur M1). L'hélice M2 par contre ne fait pas d'interaction de type van der Waals avec ce groupe d'hélices, mais est séparée de celles-ci par des molécules d'eau.

De manière très surprenante, comme on peut le voir sur les **Figures 2-13 et 2-14A**, l'interface entre le domaine extracellulaire et le domaine membranaire n'est pas au niveau de la membrane mais 10 Å au dessus! Les segments transmembranaires M1 à M4 sortent donc de la membrane du côté synaptique.

- Structure du domaine cytoplasmique

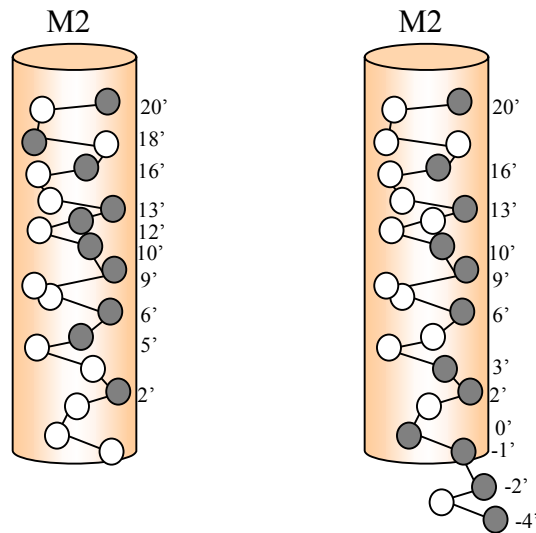
Comme on peut le voir sur la **Figure 2-12C**, la densité électronique du côté intracellulaire appartient à la fois au nAChR, mais aussi à la RAPSIN (Receptor Associated Protein of the SYNapse), une protéine de 43 kDa qui lui est associée. La RAPSIN jouerait un rôle d'ancrage et de concentration des nAChRs dans la membrane (Maimone & Merlie, 1993). La région du nAChR responsable de l'interaction avec la rapsyn est la grande boucle intracellulaire entre M3 et M4 (Huebsch & Maimone, 2003).

A 4,6 Å de résolution, on peut distinguer dans le domaine de la boucle intracellulaire du nAChR des régions en hélice α qui délimitent des ouvertures (**Figure 2-12D**). Ces ouvertures joueraient un rôle de filtre ionique. Cette hypothèse de filtre ionique a été récemment confortée par le fait que cette région influence grandement la conductance de récepteurs 5HT_{3A} – 5HT_{3B} chimères. Les mutations de trois arginines de cette boucle du 5HT_{3A}R dans leurs homologues 5HT_{3B}R augmentent de manière surprenante la conductance du récepteur de 28 fois (Kelley et al., 2003).

La structure de cette zone très variable chez les récepteurs canaux à boucle cystéine n'est malheureusement pas suffisamment résolue ici, et le rôle structural (Valor et al., 2002) et fonctionnel de ce domaine pour le nAChR reste à définir.

⁸ Se référer au prochain chapitre sur la structure des sites BNCs (p 19).

A



B

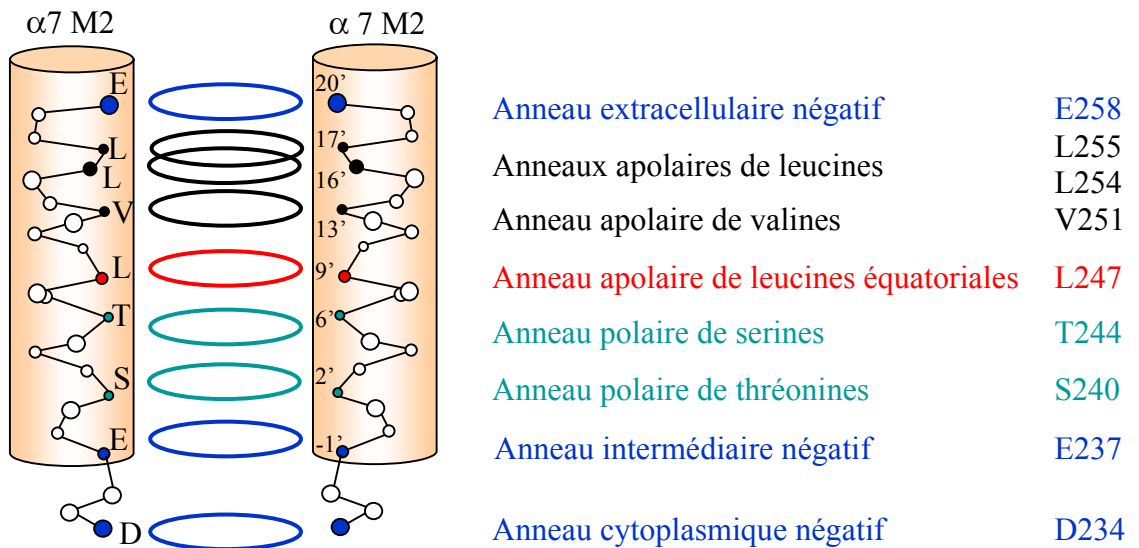


Figure 2-15. Modèle du site de liaison des bloquants non compétitifs et structure du canal. (A) Représentation consensuelle des segments M2 en hélice α droite. Le schéma de gauche représente en gris tous les résidus identifiés sur *Torpedo* par marquage de photoaffinité ou d'affinité sur les quatre sous-unités. Le schéma de droite représente en gris tous les résidus identifiés sur les nAChRs neuronaux et musculaires par SCAM. **(B)** Représentation de l'organisation du canal ionique sur la sous-unité $\alpha 7$. La position le long du segment M2 des anneaux importants dans la sélectivité ionique ou dans la sélectivité de charge de tous les nAChRs est indiquée.

D) Structure du domaine transmembranaire (sites BNCs)

- Structure du canal (site de haute affinité des BNCs)

Le fait que M2 forme les parois du canal et qu'il soit structuré en hélice α est en accord avec un grand nombre de caractérisations biochimique, physiologique et structurale réalisées auparavant sur le récepteur.

Les caractérisations par SCAM⁹ notamment (Akabas et al., 1994) avaient montré avec succès que M2 forme les parois du canal et qu'il est structuré en hélice α . (**Figure 2-15A**). Les expériences de SCAM suggèrent de plus que l'extrémité supérieure de M1 (Zhang & Karlin, 1997) ainsi que la boucle M1-M2 (Zhang & Karlin, 1998) contribuent aussi à former les parois du canal. Par ailleurs, le profil d'accessibilité des résidus en amont de la position 2', du côté intracellulaire, ne sont plus en accord avec une structure en hélice alpha. Les auteurs proposent une structure en forme de boucle accessible au solvant, en accord avec la modélisation faite par Le Novère (Le Novere et al., 1999) et avec la structure obtenue au M.E. (Miyazawa et al., 2003).

Le marquage de photoaffinité¹⁰ a aussi largement contribué à l'étude du site canal. Le neuroleptique [³H]Chlorpromazine (structure **Figure 2-8**) (Heidmann & Changeux, 1984; Giraudat et al., 1986; Giraudat et al., 1987; Giraudat et al., 1989; Revah et al., 1990), le cation organique [³H]triphénylméthyl phosphonium (structure **Figure 2-8**) (Hucho et al., 1986; Oberthur et al., 1986), l'antagoniste non-compétitif [³H]tétracaine (Gallagher & Cohen, 1999; Middleton et al., 1999; Gallagher et al., 2001), les dérivés photosensibles

⁹ Le SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method) est une technique chimique qui permet de caractériser la structure secondaire d'un domaine protéique. Tous les résidus du domaine à étudier sont mutés en cystéine (« Cysteine scanning ») et on mesure l'aptitude de ces mutants à réagir (Accessibility) avec des marqueurs réactifs hydrophiles ou hydrophobes de manière à former des liaisons covalentes. A partir de la périodicité du marquage on peut en déduire la structure secondaire de la région. La modification covalente des cystéines génère souvent des perturbations sur le récepteur que l'on peut visualiser par électrophysiologie (Karlin and Akabas, 1998).

d'anesthésique 3-[³H]azidoctanol (Pratt et al., 2000) et [¹⁴C]Amobarbital (Arias et al., 2001), le dérivé de la sonde à ADN éthidium [³H]Ethidium diazide (Pratt et al., 2000), le diazo [³H]DAF (Blanton et al., 1998), un dérivé photoactivable de neurotoxine de Naja (Machold et al., 1995) et les diazirine [¹²⁵I]TID (structure **Figure 2-8**) (White & Cohen, 1992) et TID-BE (Blanton et al., 1998) ont permis d'identifier un nombre conséquent de résidus situés sur les segments M2 des quatre sous-unités α , β , γ et δ de *Torpedo*. De plus, le marqueur d'affinité moutarde de [³H]méproadifène s'incorpore sur la sous-unité α au niveau du résidu α E262 (position 20'), du côté synaptique de M2 (Pedersen et al., 1992). Tous ces marquages, résumés en **Figure 2-15B**, sont donc en accord pour faire l'hypothèse d'un segment M2 en hélice α , entre les résidus 2' et 20', formant les parois du canal. Les sites de haute affinité des BNCs se trouvent donc situés tout le long des ces hélices M2, entre les positions 2' et 20', certains se liant de préférence du côté synaptique (Méproadifène vers résidu 20'), d'autres vers les anneaux centraux 6', 9' et 13' (tétracaine, TID, éthidium) et d'autres enfin plutôt vers le côté intracellulaire au niveau des anneaux 2', 6' et 9' (Chlorpromazine, TPMP⁺).

L'incorporation d'acides aminés non-naturels¹¹ a permis de montrer que les chaînes principales de certains acides aminés de M1 et de M2 participent aussi à la fonctionnalité du canal (England et al., 1999).

La biologie moléculaire, à l'aide de constructions chimériques entre le nAChR de bovin et celui de torpille (Imoto et al., 1986) ainsi qu'à l'aide de simples mutants et du bloqueur de canal ouvert QX-222 (Leonard et al., 1988), a permis de montrer que M2 contribue à délimiter les parois du canal. Afin de confirmer l'implication de ces résidus de M2 dans la formation du canal, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées sur

¹⁰ Le principe du marquage de photoaffinité est décrit dans la partie I. du chapitre 3 (p 63).

¹¹ Cette technique permet d'incorporer dans une protéine des acides aminés synthétiques à l'aide d'ARNt supprimeurs chimiquement modifiés. Cet ARNt reconnaît un codon stop et incorpore l'acide aminé à cet endroit (Noren et al., 1989). La variété impressionnante des acides aminés introduits n'est donc limitée que par la synthèse chimique. On dénombre aujourd'hui plus de 60 acides aminés différents introduits dans des canaux. Cette méthode produit cependant des quantités limitées de protéines, mais ce désavantage est compensé dans le cas des canaux par l'utilisation des techniques d'électrophysiologies modernes (Beene et al., 2003).

différents sous-types de nAChRs. L'importance fonctionnelle des plusieurs anneaux de résidus homologues a ainsi été soulignée (voir **Figure 2-15B**) :

⇒ Anneau intermédiaire négativement chargé (région boucle intracellulaire, position -1') : des mutations sur $\alpha 7$ E237 montrent que la conductivité du canal diminue avec le volume de la chaîne latérale de l'acide aminé (Imoto et al., 1988; Kienker et al., 1994). De plus, la mutation $\alpha 7$ E237A abolit la perméabilité pour le calcium, mais préserve celle pour les cations monovalents (Bertrand et al., 1993). Par ailleurs, cet anneau est remplacé par un anneau d'alanines chez les récepteurs à boucle cystéine de type anionique, confirmant le rôle de sélectivité ionique de cet anneau.

⇒ Anneau de thréonines (position 2') : Le mutant $\alpha 7$ S240 réagit comme $\alpha 7$ E237 décrit ci-dessus (Cohen et al., 1992). Des mutations sur $\alpha 1$ T264 affectent la diffusion des cations (Villarroel et al., 1991; Villarroel & Sakmann, 1992). Pour des volumes équivalents, des chaînes latérales polaires conduisent à des conductances plus importantes que des chaînes latérales hydrophobes (Imoto et al., 1991).

⇒ Anneau de sérines (position 6') : les mutants α T244, β G255, γ T253, δ S258 modifient la perméabilité cationique (Imoto et al., 1991; Cohen et al., 1992). La conversion d'un résidu polaire en non-polaire diminue le temps de résidence de QX-222 (Leonard et al., 1991).

⇒ Anneau équatorial de leucines (position 9') : le mutant $\alpha 7$ L247T a une pharmacologie très particulière : il n'est pas bloqué par QX-222, il possède deux états conductants (l'état désensibilisé est en fait perméant aux ions) et les antagonistes deviennent des agonistes (Revah et al., 1991; Bertrand et al., 1992). Cet anneau de leucines est par ailleurs extrêmement conservé chez tous les membres des récepteurs à boucle cystéine.

⇒ Anneau de valines (position 13') : cet anneau hydrophobe de valines, très conservé chez tous les récepteurs cationiques à boucle cystéine, est plus polaire chez les récepteurs anioniques où une thréonine remplace souvent la valine.

⇒ Anneaux de leucines (positions 16'-17') : les mutants $\alpha 7$ L254R ou T et $\alpha 7$ L255R, T ou G diminuent la perméabilité du calcium. (Bertrand et al., 1993)

⇒ Anneau extracellulaire négativement chargé (position 20') : des mutations sur $\alpha 7$ E258 montrent que la conductivité du canal est fonction de la charge de l'acide aminé en cette position (Imoto et al., 1988).

La mutagenèse dirigée a permis également d'établir les déterminants moléculaires de la sélectivité cationique du nAChR. Lorsque trois résidus de M2 du récepteur nicotinique $\alpha 7$ sont remplacés par les résidus équivalents de $\alpha 1$ GlyR ou de GABA_AR (insertion d'une proline en -2', neutralisation de la charge de l'anneau cytoplasmique 1' en remplaçant le glutamate par une alanine, et substitution d'une valine en thréonine dans l'anneau 13'), la sélectivité cationique du récepteur est convertie en sélectivité anionique (Galzi et al., 1992), montrant ainsi l'importance de la contrainte géométrique (imposée par le résidu non chargé proline) et l'importance de la répartition des charges dans la structure du canal. De manière identique et attendue, les substitutions équivalentes effectuées sur le récepteur cationique 5HT₃ génèrent un canal anionique (Gunthorpe & Lummis, 2001) et les substitutions opposées réalisées sur le récepteur anionique GlyR donnent un récepteur cationique (Keramidas et al., 2000). Dans ce dernier cas cependant, l'unique modification sur l'anneau 1' d'une alanine en glutamate suffit à générer un récepteur cationique (Keramidas et al., 2002). De manière surprenante par contre, la mutation $\alpha 7$ V251 en aspartate au lieu de thréonine (en plus des deux autres modifications décrites par Galzi et collaborateurs) aboutit aussi à un canal anionique, alors qu'un anneau de charges négatives est créé au centre du canal (Corringer et al., 1999). Par ailleurs, un récepteur GABA cationique a récemment été découvert chez *C.elegans*. Ce récepteur a été caractérisé au niveau moléculaire : il est similaire aux récepteurs GABA aux niveaux de presque tous les domaines, notamment le site GABA, mais diffère au niveau du segment M2 délimitant le canal : il n'a pas de proline en position -2', il contient une charge négative à l'anneau 1' et une phénylalanine en position 13', lui conférant ainsi toutes les caractéristiques moléculaires nécessaires à la formation d'un canal de sélectivité cationique (Beg & Jorgensen, 2003).

Des études structurales plus récentes menées par RMN du solide sur les peptides correspondant à δ M2 ((Opella et al., 1999), voir (Montal & Opella, 2002) pour revue), par RMN en solution sur α M2 (Pashkov et al., 1999) et β 2M2 (Yushmanov et al., 2003) et par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier sur le nAChR de torpille purifié (Methot et al., 2001) concluent aussi à une structure majoritairement en hélice α , bien qu'un désaccord subsiste concernant l'inclinaison de cette hélice dans la membrane.

- **Structure de l'interface lipides-protéine (site de basse affinité des BNCs)**

La structure des trois autres segments M1, M3 et M4 a elle aussi été l'objet de nombreuses études par marquage de photoaffinité, mutagenèse dirigée, fluorescence, FTIR et RMN.

L'utilisation de marqueurs de photoaffinité de l'interface lipide-protéine a contribué grandement à l'étude structurale de ce domaine chez *Torpedo*. Les sondes DAF, TID et TID-BE, utilisées avec succès pour le site de haute affinité des BNCs, marquent aussi des résidus localisés dans le site de basse affinité des BNCs. Le DAF marque plusieurs résidus du segment M4 de toutes les sous-unités de *T.californica* (Blanton et al., 1998). Le TID s'incorpore de façon non-spécifique au niveau des M4 et des M3 de toutes les sous-unités (Blanton & Cohen, 1992; Blanton & Cohen, 1994) et au niveau des M1 de la sous unité α (Blanton & Cohen, 1994). Le TID-BE marque les mêmes résidus que le TID au niveau des segments α M4, γ M4, mais s'incorpore également sur plusieurs résidus de α M1 et β M1 (Blanton et al., 1998). D'autres dérivés photoactivables se liant uniquement au site de basse affinité des BNCs ont également été utilisés. Deux dérivés photosensibles de phospholipides (PCI et PCII) ont été utilisés dans un premier temps pour sonder l'environnement lipidique du récepteur. Le groupement arylazido est situé sur la tête polaire de PCI et sur une des queues aliphatiques de PCII. Ces deux sondes s'incorporent sur toutes les sous-unités (Giraudat et al., 1985). Le 1-azidopyrene (1-AP) est un marqueur de photoaffinité fluorescent qui s'incorpore dans les segments M4 de toutes les sous-unités (Blanton & Cohen, 1992). Le [125 I]TIDPC/16 est un analogue phospholipidique du TID : une phosphatidylcholine (PC) contenant une chaîne grasse en C₁₆ et une fonction TID située au bout de la deuxième chaîne grasse en C₁₀. Ce dérivé, dont la partie photosensible est située au milieu de la membrane, marque à nouveau les mêmes résidus que le TID et le TID-BE au niveau des segments α M1, α M4 et γ M4 (Blanton et al., 1998). Le dérivé de cholestérol [125 I]Azidocholestérol marque les segments M4 de α et γ et M1 de α (Corbin et al., 1998). Récemment, les dérivés non-radioactifs acétate et triméthylacétate de TID (TIDBTMAc et TIDBAC), ainsi que la benzophénone et le dérivé photoactivable de cholestérol CBPP ont été utilisés par ECP-MS¹²

¹² L'ECP-MS (Electrophysiology-Coordinated Photolabelling with subsequent Mass Spetrometry analyses) a été récemment développé par l'équipe de H.A. Lester. Cette

sur le nAChR musculaire murin. Ils ont permis notamment l'identification de plusieurs résidus sur $\alpha 1$ M4 qui sont homologues à ceux marqués chez Torpedo par les précédents dérivés de TID (Leite et al., 2003). Le dérivé photosensible d'anesthésique volatile [^{14}C]Halothane a récemment marqué les tyrosines αY213 et δY228 des segments M1. Le stéroïde [^3H]Progémestone réagit avec le domaine M4 des sous-unités α , β et γ , marquant essentiellement les mêmes résidus que le DAF et les dérivées TID (Blanton et al., 1999).

L'ensemble de ces résultats est en accord, d'après la périodicité des marquages, pour permettre de proposer une structure en hélice α pour les segments M3 et M4. Par contre il semble difficile d'attribuer par cette technique une structure à M1. Pour revue voir (Arias, 1998).

La mutagenèse dirigée a elle aussi contribué à l'étude de la structure de M4 : des résidus tryptophane ont été incorporés en 12 positions différentes le long de M4. La périodicité de l'altération de l'assemblage du nAChR et de la fonctionnalité du canal permettent de confirmer l'hypothèse d'une hélice α pour M4 (Tamamizu et al., 2000).

Etudes des cystéines membranaires: l'interface lipides-protéine n'a pas été étudiée par SCAM, mais les nAChRs de torpille possèdent naturellement des cystéines sur leurs segments transmembranaires M1 et M4. L' αC222 de M1 a pu notamment être localisée à 7 Å des têtes polaires du côté synaptique à l'aide d'une sonde fluorescente : le N-pyrenyl-maleimide. Ce résultat suggère que M1 forme une structure irrégulière différente d'une structure en hélice α droite (Kim & McNamee, 1998), en désaccord avec la structure par M.E. (Miyazawa et al., 2003). Le N-pyrenyl-maleimide est probablement capable de réagir aussi sur les cystéines homologues conservées des 3 autres sous-unités (Marquez et al., 1989), notamment γ M1 C230 (Barrantes et al., 2000) et il se fixe aussi suivant les conditions expérimentales sur d'autres cystéines localisées sur le segment M4 des sous-unités α (C412) et γ (C451) (Li et al., 1990; Barrantes et al., 2000), et sur la grande boucle intracellulaire de γ

technique permet d'effectuer du marquage de photoaffinité sur des récepteurs exprimés en oocytes à l'aide de marqueurs froids. L'enregistrement simultané des courants permet de marquer le récepteur sous différents états et de suivre ses réorganisations structurales. L'identification des peptides et résidus alkylés se fait ensuite par spectrométrie de masse (Leite et al., 2003).

(C416 et C420) (Li et al., 1990). Ces résultats sont en accord avec une structure en hélice α pour M4 mais pas pour M1, qui semble plutôt être soit une hélice α très courbée, soit une structure en partie non- α (Barrantes et al., 2000).

Des études par dichroïsme circulaire et ATR-FTIR (Attenuated total reflection Fourier transform infrared) sur des peptides (isolés par protéolyses, purifiés et reconstitués dans des vésicules) montrent que les segments M2 à M4 sont majoritairement en hélice α , alors que M1 semble être soit une hélice α tordue, soit en partie seulement en hélice α (Corbin et al., 1998). Ces résultats sont en accord avec la modélisation moléculaire (Le Novère et al., 1999) mais en désaccord avec la structure complètement en hélice α obtenue par M.E. (Miyazawa et al., 2003). D'autres études de FTIR sur nAChR purifié prédisent M2, M3 et M4 en hélice α (Methot et al., 2001).

Les structures RMN des domaines M1 (Grant et al., 1999) et M3 (Lugovskoy et al., 1998) décrivent ces deux segments comme des hélices α , en accord avec la M.E. (Miyazawa et al., 2003). Pour une revue récente voir (Williamson et al., 2004).

En conclusion, les structures obtenues par M.E. (Miyazawa et al., 2003) des segments M3 et M4 concordent bien avec les résultats biochimiques pour décrire ces segments en hélice α . Par contre, les études structurales sur M1 (M.E., RMN...) qui attribuent à ce segment une structure en hélice α ne semblent pas vraiment en accord avec les analyses indirectes qui supposent une structure plus complexe pour M1.

E) Une structure RX du nAChR pour bientôt ?

Sur les 26 000 structures cristallines déposées dans la PDB, moins de 1% concernent les protéines membranaires¹³, bien que celles-ci représentent 60 à 70 % des cibles thérapeutiques. Ces chiffres indiquent clairement les difficultés rencontrées en biologie structurale pour ce type de protéines. Les principaux obstacles rencontrés sont l'obtention de

¹³ Les sites internet <http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html> et http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html recensent toutes les protéines membranaires de structure tridimensionnelle connue.

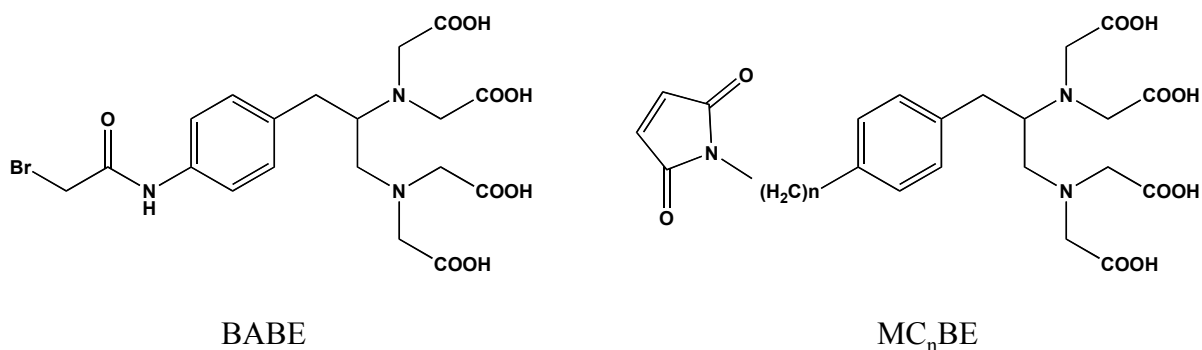
quantités suffisantes pour entreprendre des études structurales, et la cristallisation de ces protéines hydrophobes (pour revue voir (Caffrey, 2003)).

Depuis une quinzaine d'années pourtant le nombre de structures atomiques de protéines membranaires s'accroît. On connaît notamment la structure :

- de nombreuses porines bactériennes et autres tonneaux β (Cowan et al., 1992; Schirmer et al., 1995; Ferguson et al., 1998; Forst et al., 1998; Koronakis et al., 2000; Faller et al., 2004)
- de rhodopsines bactériennes (Pebay-Peyroula et al., 1997; Kolbe et al., 2000; Luecke et al., 2001)
- de toxines (Song et al., 1996)
- d'un récepteur couplé aux protéines G (Palczewski et al., 2000)
- de quelques transporteurs (Chang & Roth, 2001; Locher et al., 2002; Murakami et al., 2002; Abramson et al., 2003; Huang et al., 2003; Yu et al., 2003)
- d'une ATPase (Toyoshima et al., 2000)
- de complexes « light-harvesting » (Liu et al., 2004)
- de quelques aquaporines (Murata et al., 2000; Fu et al., 2002; Van den Berg et al., 2004)
- de photosystèmes (Jordan et al., 2001; Zouni et al., 2001; Kurisu et al., 2003; Stroebel et al., 2003; Ferreira et al., 2004)
- de plusieurs protéines respiratoires (Iverson et al., 1999; Lancaster et al., 1999; Stock et al., 1999; Jormakka et al., 2002; Pebay-Peyroula et al., 2003; Yankovskaya et al., 2003)
- d'oxydases (Iwata et al., 1995; Tsukihara et al., 1996)
- de complexes cytochrome bc1 (Xia et al., 1997; Iwata et al., 1998)

De manière très intéressante pour la compréhension des récepteurs canaux, les structures de plusieurs canaux potassium voltage-dépendant (Doyle et al., 1998; Nishida & MacKinnon, 2002; Jiang et al., 2003; Kuo et al., 2003), de canaux potassium mécanosensibles (Chang et al., 1998; Bass et al., 2002), d'un canal potassium activé par le calcium (Jiang et al., 2002) ainsi que d'un canal chlore (Dutzler et al., 2002) ont été récemment résolues. Tous ces canaux traversent la membrane, comme les récepteurs canaux à boucle cystéine, par l'intermédiaire d'hélices α . Les canaux potassium sensibles au voltage (pour revue récente voir (Sukharev & Anishkin, 2004)) et les canaux potassium voltage-dépendants (pour revue récente voir (Ahern & Horn, 2004)) sont, comme les nAChRs, des oligomères de sous-unités

A



B

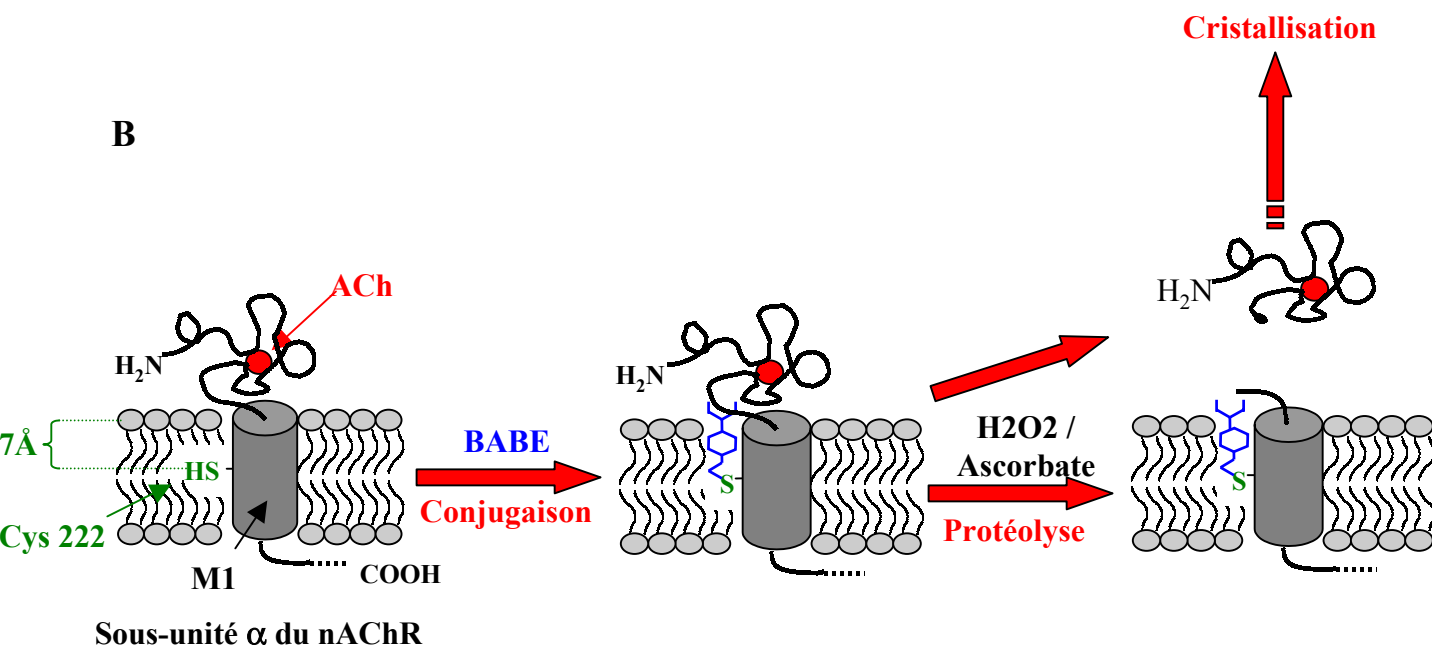


Figure 2-16: Projet de protéolyse de la partie N-terminale extracellulaire de la sous-unité alpha du nAChR de *Torpedo marmorata*. (A) Structure des agents de coupures BABE (à gauche) et MC_nBE (à droite), avec n = 3 ou 5. (B) Alkylation de la Cys 222 du segment transmembranaire M1 de la sous-unité α du nAChR par le BABE en vue de la protéolyse dirigée du récepteur au ras de la membrane. Une purification efficace de ce fragment aurait permis d'envisager la cristallogénèse de ce peptide et accéder ainsi à la structure tridimensionnelle du site de liaison de l'ACh.

identiques qui entourent un canal. Dans ces trois types de canaux, le pore ionique est donc à l'interface de sous-unités, délimité par un seul segment transmembranaire (M1 pour MscL, M2 pour le nAChR et l'hélice interne pour KirBac1.1, pour revue voir (Doyle, 2004)). Les canaux chlore par contre sont des dimères dans lesquels chaque protomère est un canal (pour revue récente voir (Dutzler, 2004)). Un mécanisme d'ouverture des canaux potassium voltage-dépendant a pu même être proposé suite à la cristallisation d'un autre canal potassium sous forme ouverte (Jiang et al., 2002), mais ce mécanisme conduisant à l'ouverture d'un très grand pore est maintenant remis en question (Webster et al., 2004).

Une approche différente pour étudier la structure d'une protéine transmembranaire est d'obtenir la structure à résolution atomique soit de la partie hydrosoluble de la protéine, soit d'une protéine homologue à cette région extramembranaire. Cette première technique d'expression a permis notamment d'avoir la structure RX du domaine de liaison des récepteurs du glutamate métabotropes mGluR1 (Kunishima et al., 2000) et ionotropes iGluR2 (Armstrong et al., 1998; Armstrong & Gouaux, 2000) et iGluR0 (Mayer et al., 2001). Plusieurs tentatives de surexpression de la partie extracellulaire de la sous-unité α du nAChR musculaire (West et al., 1997; Psaridi-Linardaki et al., 2002; Yao et al., 2002), du nAChR de torpille (Schrattenholz et al., 1998; Alexeev et al., 1999; Grant et al., 1999) et du nAChR $\alpha 7$ (Wells et al., 1998; Fischer et al., 2001; Tsetlin et al., 2002), ainsi que des quatre sous-unités de torpille (Tierney & Unwin, 2000) ont été entreprises. Dans cette dernière étude, des images en microscopie électronique montrent que ces quatre domaines extracellulaires sont capables de s'assembler pour former un pentamère. Des études de dichroïsme circulaire ont parfois pu être abordées ont permis d'attribuer à ce domaine une structure majoritairement en feuillets β . Cependant, ces études se sont heurtées aussi à de multiples problèmes : problèmes de solubilité, formation de corps d'inclusion ou protéine exprimée ne liant plus les ligands classiques. Plus récemment, une construction chimérique dans laquelle la boucle cystéine hydrophobe d' $\alpha 7$ a été substituée par la boucle plus soluble de l'AChBP (Brejc et al., 2001)¹⁴ permet de résoudre les problèmes de solubilité de ce domaine (Avramopoulou et al., 2004). Il semble effectivement que cette boucle cystéine hydrophobe s'ancre en partie dans la membrane (Brejc et al., 2001), et pose des problèmes de solubilité du domaine extracellulaire seul.

De notre côté, nous avons tenté, lors de mon DEA et au début de ma thèse, d'isoler le

¹⁴ Voir la partie concernant la structure de l'AChBP, partie III.F de ce chapitre (p 30).

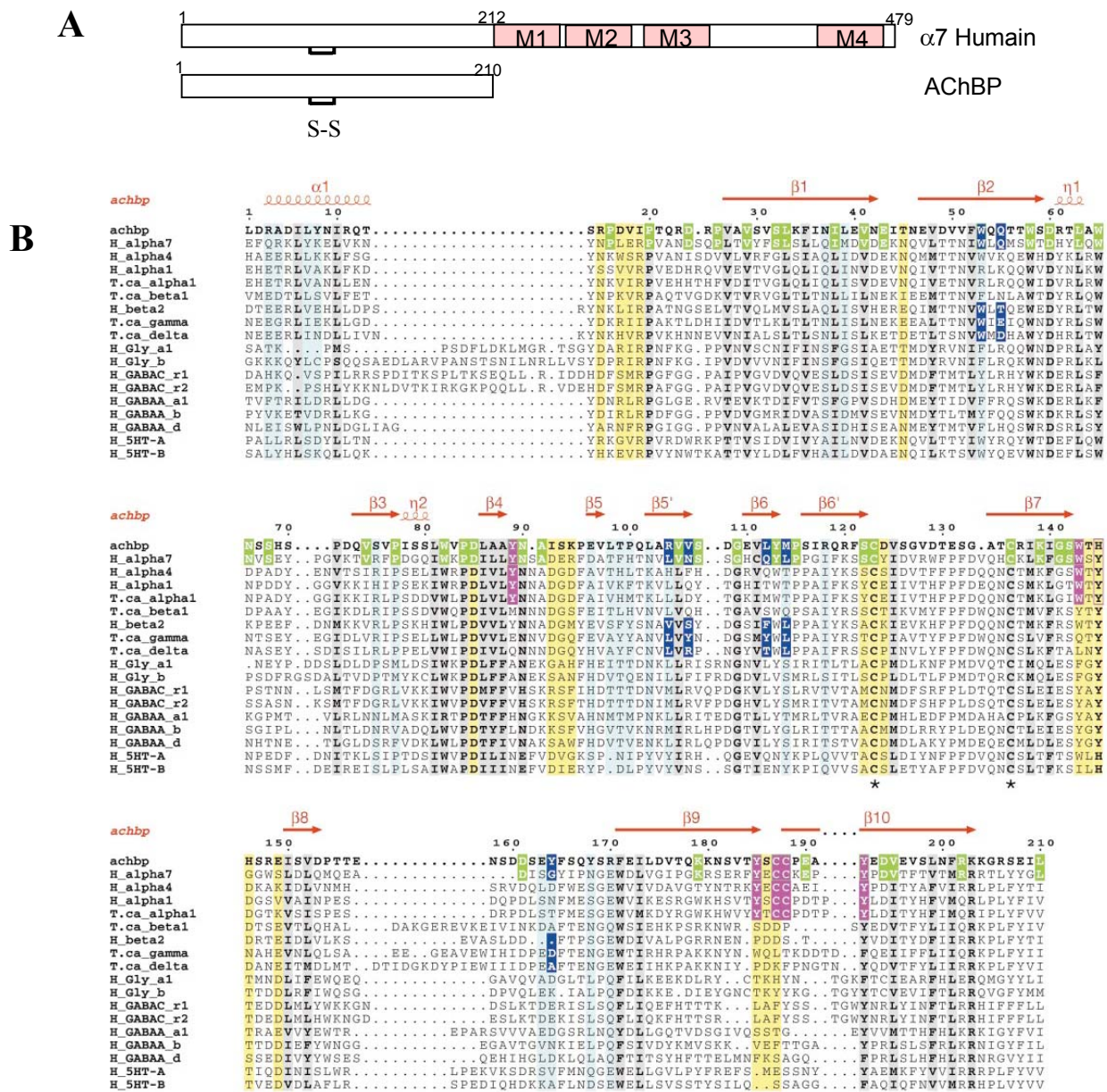


Figure 2-17. Homologies de séquence entre l'AChBP et le domaine extracellulaire des récepteurs canaux à boucle cystéine. (A) représentation schématique de l'homologie de séquence entre $\alpha 7$ et l'AChBP. On peut noter la présence du pont disulfure conservé. (B) Alignement de séquences de l'AChBP avec le domaine N-terminal des récepteurs membres de la famille à boucle cystéine. Numérotation AChBP. D'après (Brejc et al., Nature 2001). Légende: H.: humain, T.ca : *Torpedo californica*.

α : hélice α ; β : brin β ; η : hélice 3_{10}

* : extrémités de la boucle cystéine

X : résidus identiques entre l'AChBP et $\alpha 7$

X : résidus conservés dans toute la famille

X : résidus situés à l'interface de deux sous-unités du côté (+)

X : résidus situés à l'interface de deux sous-unités du côté (-)

X : résidus du domaine principal de liaison du site ACh

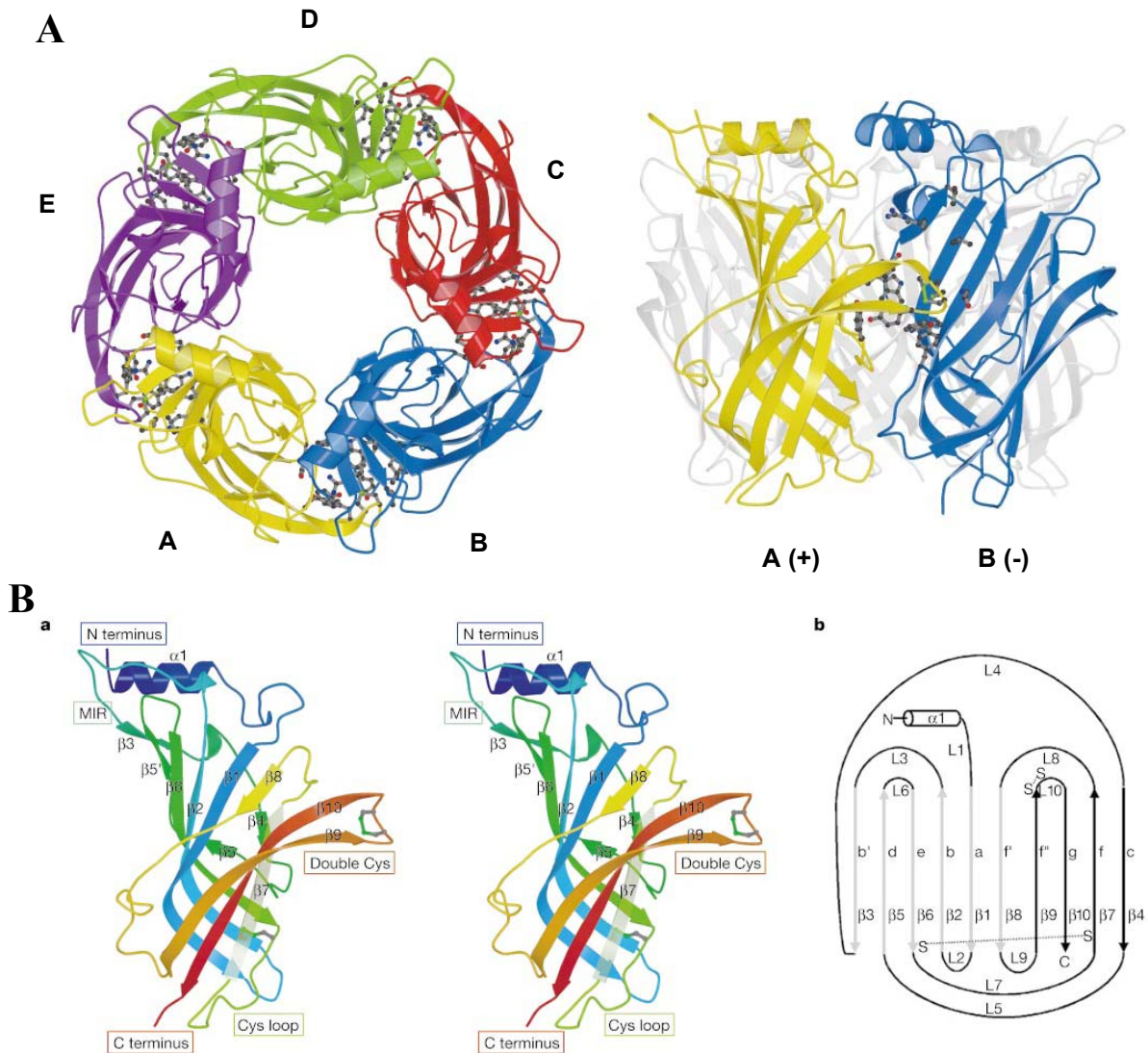
X : résidus du domaine complémentaire de liaison du site ACh

domaine extracellulaire de la sous-unité α de *Torpedo marmorata* à l'aide de protéases chimiques de type [EDTA / Fe / H₂O₂]. Les protéases chimiques décrites en **Figure 2-16** (BABE, MC₃BE et MC₅BE) ont été développée pour permettre, après alkylation de cystéines ciblées sur une protéine, de réaliser une protéolyse régiosélective après ajout d'ascorbate et d'eau oxygénée (Rana & Meares, 1991). Cette protéolyse, contrairement aux protéolyses enzymatiques (Trypsine, *Staphylococcus aureus* V8 ...) ou chimiques (Bromure de cyanogène) est indépendante de la nature des acides aminés présents sur le site de coupure. L'objectif de ce travail était de cliver sélectivement et efficacement le fragment N-terminal extracellulaire de la sous-unité α du récepteur nicotinique de torpille à l'aide de ces protéase chimique ciblée. Une production et une purification efficaces de ce fragment polypeptidique auraient permis d'entreprendre ensuite la cristallisation en vue de l'étude structurale par rayon X de ce peptide qui comprend le site de liaison de l'ACh. L' α C222 du segment M1, située à environ 7 Å de profondeur dans la membrane (Kim & McNamee, 1998), semblait donc une cible parfaite pour fixer ces protéases et cliver le récepteur au niveau de la membrane (**Figure 2-16B**). Des études de fluorescence tendaient à montrer que les dérivés MC₃BE et MC₅BE, mais pas le BABE, sont capables de se fixer à l' α C222. Cependant aucune protéolyse n'a pu être mise en évidence (données non publiées). Par ailleurs, la publication de la structure d'une protéine de mollusque soluble et homologue au domaine extracellulaire d' α 7 (Brejc et al., 2001) nous a amené à réorienter mon sujet de thèse. La publication de cette structure de l'AChBP a apporté une réelle avancée dans la compréhension du fonctionnement du nAChR et sera décrite ci-dessous.

F) l'AChBP, une protéine homologue au domaine extracellulaire du nAChR

- Localisation et fonction de l'AChBP

L'acetylcholine binding protein (AChBP) est une protéine découverte récemment dans le système nerveux central d'un escargot d'eau douce étudié depuis longtemps : *Lymnaea stagnalis*. Cette protéine, de par sa capacité à lier l'ACh, est capable de moduler la transmission synaptique. En effet, la libération d'ACh présynaptique active les cellules gliales qui sécrètent alors l'AChBP dans la fente synaptique, ce qui conduit à une inactivation de la transmission synaptique (Smit et al., 2001).



- Homologie avec les nAChRs

Par ailleurs, l'AChBP partage de nombreuses caractéristiques communes avec les nAChRs : l'analyse de sa structure primaire (voir **Figure 2-17**) révèle une bonne homologie de séquence (24%) avec le domaine extracellulaire d' $\alpha 7$ ainsi que la présence de la boucle cystéine très conservée chez tous les membres des récepteurs nicotinoïdes (boucle de 14 résidus au lieu de 15 cependant). L'AChBP recombinante exprimée chez *Pichia pastoris* s'assemble en homopentamères stables. De plus, l'AChBP contient tous les résidus conservés chez les nAChRs, notamment ceux essentiels à la liaison des agonistes et antagonistes compétitifs. Des tests de liaison montrent effectivement que l'AChBP recombinante a une pharmacologie proche de celle du nAChR $\alpha 7$: elle possède 5 sites de liaison et lie notamment les agonistes épibatidine, nicotine, ACh et CCh, mais aussi les antagonistes α -BgTx et dTC avec des affinités apparentes proches de celles d' $\alpha 7$. Les antagonistes muscariniques se lient aussi à l'AChBP, une caractéristique pharmacologique des nAChRs $\alpha 9$ (Smit et al., 2001). En conclusion, l'AChBP est un homologue soluble du domaine extracellulaire de liaison des récepteurs nicotiniques. Au vue de ces propriétés, il semblait nécessaire d'obtenir la structure de ce récepteur soluble.

Plus récemment, une autre AChBP (A-AChBP) a été isolée chez *Aplysia californica* (Hansen et al., 2004). Elle possède 33% d'homologie avec celle de *Limnaea stagnalis* (L-AChBP) et 26 % d'homologie avec le domaine extracellulaire d' $\alpha 7$, s'assemble également en pentamères, mais possède des propriétés de liaison distinctes de L-AChBP. L'affinité de l' α -BgTx est notamment 100 fois plus faible alors que celle de l' α -Conotoxine ImI est 16 000 fois plus élevée. Il serait donc important d'en obtenir la structure afin de localiser les déterminants moléculaires de cette sélectivité.

- Structure de l'AChBP

L'AChBP recombinante a été cristallisée et sa structure déterminée dans un premier temps sans ligand spécifique à 2,7 Å de résolution (Brejc et al., 2001) (voir **Figure 2-18**) puis plus récemment à 2,1 Å sans ligand et avec la nicotine (2,2 Å) et la carbamylcholine (2,5 Å) dans le site de liaison (Celie et al., 2004).

L'homopentamère d'AChBP se présente comme un cylindre creux de 62 Å de hauteur, 80Å de diamètre externe et ~18 Å de diamètre interne.

Le protomère d'AChBP est constitué d'une hélice α N-terminale, de deux petites hélices 3_{10} , et de 10 brins β . Cet arrangement en feuillet β est de type immunoglobine, avec une boucle et un brin β en plus. Les brins β sont particulièrement tordus et sont divisés en deux domaines hydrophobes, repliés en sandwich et reliés entre eux par le pont disulfure très conservé chez les récepteurs canaux à boucle cystéine. De manière inattendue, cette boucle chez AChBP est moins conservée : elle possède un résidu de moins et est globalement plus hydrophile. Elle relie entre eux les brins β antiparallèles β_6 et β_7 en bas de la protéine, près de l'interface entre dimères, et pourrait donc entrer en contact avec la membrane chez les récepteurs membranaires. Le cœur de la protéine est composé majoritairement de résidus hydrophobes, qui sont conservés parmi les récepteurs à boucle cystéine.

Le pore central est très hydrophile, et possède sur chaque protomère une large cavité hydrophobe.

L'interface des sous-unités est formée exclusivement de boucles sur la face (+) (voir **Figure 2-18** pour la nomenclature des faces) et principalement d'éléments de structure secondaires α ou β sur la face (-). Les interactions y sont principalement hydrophobes, mais il existe un pont salin (GluA149-ArgB3 et ArgB104). Les résidus disposés à l'interface ne sont pas très conservés au sein des récepteurs à boucle cystéine, et différentes combinaisons chez les récepteurs ionotropes peuvent donc avoir différentes interactions et donc différentes propriétés pharmacologiques. Des interactions précises à l'interface ne semblent donc pas essentielles à l'établissement d'une structure pentamérique.

- Structure des sites ACh

Il existe également une autre cavité, située à l'interface de deux sous-unités, du côté extérieur, et qui contient soit une molécule d'HEPES (Brejc et al., 2001), soit les ligands nicotiniques CCh ou nicotine (Celie et al., 2004). Bien que l'HEPES ait une faible affinité pour les sites ACh (100 mM), les conditions de cristallisation (100 –150 mM HEPES) ont conduit cette molécule à occuper les sites ACh. Ces cavités sont donc les sites ACh et sont situés à mi-hauteur, soit à 30 Å du C-terminal.

Les sites ACh sont constitués de trois boucles du côté (+) (boucles A, B et C) et de 3 brins β (subdivisés en 2 domaines D et E) et d'une boucle (boucle F) du côté (-) de l'interface AB. De nombreux résidus aromatiques localisés sur les boucles A (TyrA89), B (TrpA143), C (TyrA185 et TyrA192) et F (TyrB164) ainsi que sur le brin D (TrpB53)

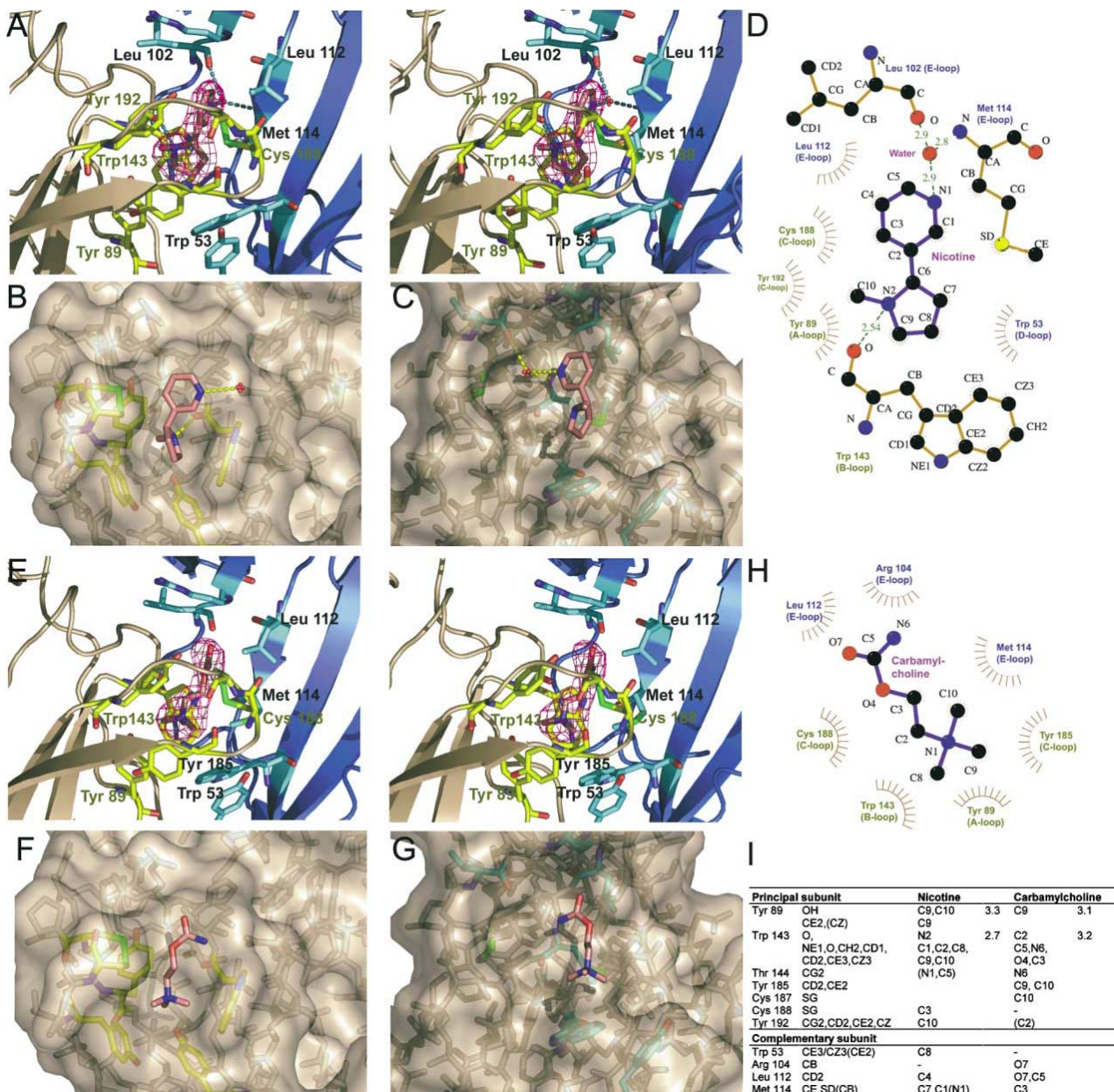


Figure 2-19. Liaison de l'acétylcholine et de la nicotine à l'AChBP. (A) Vue stéréo de la liaison de la nicotine au site ACh, formé d'une composante principale (jaune) et d'une composante complémentaire (bleue). (B et C) Surface de la composante principale (B) et complémentaire (C) du site ACh liant la nicotine. (D) Schéma d'interactions hydrogène et van der Waals entre la nicotine et l'AChBP. (E–H) Liaison de la carbamylcholine vue en stéréo (E), en surface (F et G) et de manière schématique (H). (I) Atomes jouant un rôle dans l'interaction avec ces ligands (à moins de 3,9 Å). Entre parenthèses sont indiqués les atomes participant à la liaison des ligands dans moins de la moitié des sous-unités. Les distances inférieures ou égales à 3,3 Å sont indiquées. D'après (Celie et al., 2003).

forment la partie inférieure ainsi que les parois de cette poche. La chaîne principale d'AlaA145 (boucle B) et les chaînes latérales de MetB114 (domaine E), de GlnB55 (brin D) et le pont disulfure CysA187-CysA188 (boucle C) complètent les parois de cette poche. Quelques résidus hydrophobes (ValB106, LeuB112 et la partie aliphatique d'ArgB104) du brin E contribuent à former le « couvercle » de cette poche.

L'accès à cette poche semble pouvoir se faire de dessus (par la boucle E) ou de dessous (par la boucle F) pour les petits ligands comme l'ACh. Pour les plus gros ligands comme la dTC, une ouverture du site est nécessaire, par exemple par un mouvement de la boucle C.

La première structure d'AChBP, bien que faiblement résolue, montre une interaction cation - π entre un atome d'azote chargé de l'HEPES et le TrpA143 de la boucle B (Brejc et al., 2001). Une meilleure résolution de ce complexe est toujours en accord avec cette interaction cation - π , mais positionne le groupement sulfonate dans l'autre direction (Celie et al., 2004).

La structure de l'AChBP en présence de deux agonistes nicotiniques CCh et nicotine (Celie et al., 2004) montre qu'ils se lient au même niveau dans l'AChBP que la molécule d'HEPES. Ils établissent tous les deux des contacts étroits avec la chaîne latérale du TrpA143 (boucle B), mais aussi avec la TyrA192, la TyrA185 (boucle A) et le TrpB53 (boucle D), ces deux derniers résidus étant importants plus particulièrement pour la liaison de la nicotine. Le groupement TyrA89 (boucle A) établit également des contacts avec les ligands, mais par l'intermédiaire de son groupement hydroxyle. Le pont disulfure vicinal (boucle A) est aussi impliqué dans la liaison, majoritairement CysA187 pour la CCh et CysA188 pour la nicotine. Le domaine E interagit aussi avec les deux ligands. Par ailleurs, la nicotine établit aussi deux liaisons hydrogène : une entre le N1 du noyau pyridine et les chaînes principales de LeuB102 et MetB114 par l'intermédiaire d'une molécule d'eau, et l'autre entre le N2 du noyau pyrrolidine et le carbonyl du TrpA143. Ce carbonyl interagit aussi avec un CH₂ de la CCh. La **Figure 2-19** montre les interactions de ces deux ligands avec l'AChBP au niveau moléculaire.

Il est intéressant de noter que le TrpA143, qui joue ici un rôle crucial dans la reconnaissance des ligands cholinergiques, est stabilisé par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre le NH de la liaison peptidique 143/144 et la charge négative de l'AspA85. Cet aspartate, très conservé dans la famille des canaux à boucle cystéine, a donc probablement un rôle structural et fonctionnel, notamment en polarisant l'oxygène du carbonyl de W143, ce qui favoriserait l'interaction avec les ligands cationiques.

Ces deux ligands induisent de faibles changements conformationnels (identiques pour CCh et nicotine) par rapport à la structure avec l'HEPES, principalement au niveau de la boucle C. Il y a notamment formation d'une liaison hydrogène entre les chaînes latérales de la LysA139 et de la TyrA185. Cette lysine est très conservée au sein de la famille à boucle cystéine, et pourrait être impliquée dans des phénomènes allostériques.

G) Structure du domaine extracellulaire du nAChR (sites ACh)

Lorsqu'on obtient la structure atomique d'une protéine, on s'empresse de voir si cette structure est en accord avec les nombreuses données expérimentales obtenues au préalable, et ceci afin de valider cette structure. En ce qui concerne les récepteurs canaux à boucle cystéine, et notamment le nAChR, les données récoltées depuis les trente dernières années sont conséquentes et s'accordent bien avec la structure de l'AChBP.

- Structure générale du domaine

Les dimensions de l'AChBP sont en accord avec celles trouvées pour le nAChR de torpille par M.E. (Miyazawa et al., 1999). Une prédiction de topologie de type Ig avait été suggérée pour le nAChR (Le Novère et al., 1999). Dans ce modèle bidimensionnel, le domaine extracellulaire est constitué d'une hélice α , suivie d'un brin β , une autre hélice α et enfin un feuillet de 10 brins β . Au vu de la structure de l'AChBP, on peut dire que cette prédiction de structure secondaire était assez remarquable.

Les cavités situées dans le pore central de l'AChBP sont probablement celles observées par M.E. à 4,6 Å de résolution. L'hypothèse de chemin d'accès au site ACh pour ces cavités (Miyazawa et al., 1999) semble cependant peu probable, bien qu'on ne puisse pas exclure que ces cavités s'ouvrent sur les sites agoniste dans un autre état conformationnel du récepteur nicotinique.

De nombreux modèles moléculaires du domaine N-terminal extracellulaire de récepteurs ionotropes à boucle cystéine ont été construits par homologie avec la structure de l'AChBP. On recense notamment des modèles :

- du nAChR $\alpha 7$, le récepteur présentant le plus d'homologie avec l'AChBP (Le Novère et al., 2002; Schapira et al., 2002; Chou, 2004; Dutertre et al., 2004)
- du nAChR $\alpha 4\beta 2$ (Schapira et al., 2002)

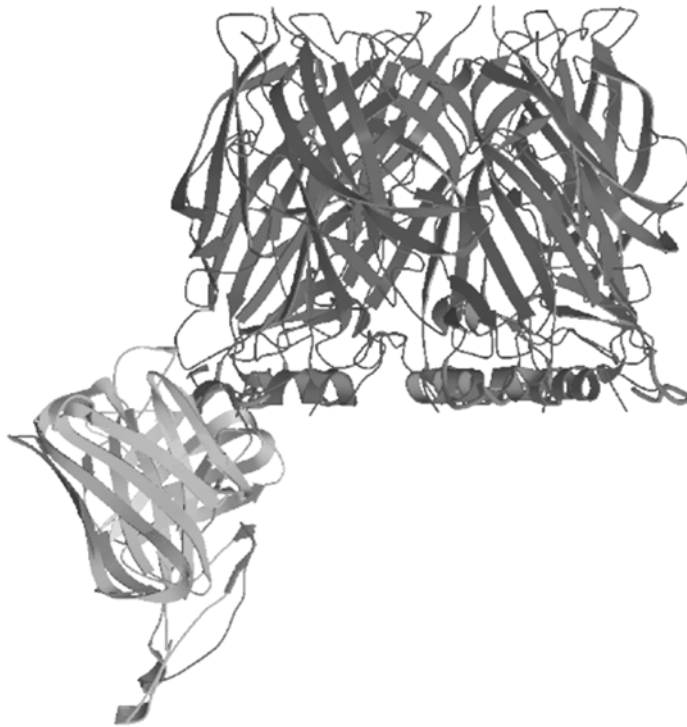


Figure 2-20. Modélisation du complexe entre un antigène et l'AChBP. La structure d'un complexe antigène-peptide MIR du nAChR (Kleijnung et al., 2000) a été superposée à la structure de l'AChBP. D'après (Smit et al., 2003).

- du nAChR $\alpha 4\beta 4$ (Schapira et al., 2002)
- du nAChR $\alpha 3\beta 2$ (Schapira et al., 2002; Dutertre et al., 2004)
- du nAChR $\alpha 3\beta 4$ (Costa et al., 2003)
- du nAChR musculaire (Molles et al., 2002; Sine et al., 2002)
- du nAChR de torpille (Sullivan et al., 2002)
- du récepteur GABA_A (Cromer et al., 2002; Trudell, 2002)
- du récepteur 5HT₃ (Maksay et al., 2003; Reeves et al., 2003; Price & Lummis, 2004)
- du récepteur glycine (Absalom et al., 2003)

Ces modèles tentent d'analyser les interactions ligand-récepteur et de comprendre les variabilités pharmacologiques entre les différents sous-types de récepteurs. La structure de l'AChBP complexée avec la CCh et la nicotine (Celie et al., 2004) montre que les dockings effectués sur les modèles correspondent relativement bien avec la structure, mais que certaines interactions et certains changements moléculaires ne peuvent pas être prédits.

Il est toutefois certain qu'un modèle ne substituera jamais une structure cristallographique et qu'il serait toujours extrêmement utile d'obtenir la structure atomique du domaine extracellulaire du récepteur ou mieux encore du récepteur dans sa totalité.

- Localisation de la MIR

Au niveau du nAChR musculaire, une région immunogène (MIR) comprise entre les résidus $\alpha_1 67$ et $\alpha_1 76$ joue le rôle d'épitope dans la maladie autoimmune *Myasthénia gravis* (Tzartos et al., 1991). Bien que la région homologue correspondante chez AChBP n'ait pas d'homologie de séquence, sa localisation, sur la boucle L3 en haut du pentamère, permet d'envisager la fixation d'un anticorps à ce niveau. La **Figure 2-20** montre une modélisation de cette interaction (Smit et al., 2003).

- Le site agoniste

Le site agoniste a lui aussi été, comme le site BNC, l'objet de très nombreuses études structurales et fonctionnelles. Les marquages covalents (affinité,

Année	Technique (a)	Ligands (b)		Sous-unités marquées	Résidus identifiés	Boucles	Références
1984	MA	[³ H]-MBTA	antagoniste	α	αCys192 (αCys193)	C	Kao et al., 1984
1988	MPA	[³ H]-DDF	antagoniste	α γ δ	αTryp149 (αTyr151) αTyr190 αCys192 αCys193 αTyr198	B C	Dennis et al., 1988
1989	MA	[³ H]- Lophotoxine	antagoniste	α	αTyr190	C	Abramson et al., 1989
1990	MPA	[³ H]-DDF	antagoniste	α γ δ	αTyr93 (αTrp86)	A	Galzi et al., 1990
1991	MPA	[³ H]-Nicotine	agoniste	α γ	αTyr190 αCys192 αCys193 αTyr198	C	Middleton and Cohen, 1991
1991	MA	Moutarde de [³ H]-ACh	agoniste	α	αTyr93	A	Cohen et al., 1991
1995	PC	[³ H]-GCP	antagoniste	δ	δAsp165 δAsp180 δGlu182	F	Czajkowski and Karlin, 1995
1997	MPA	[³ H]-d- Tubocurarine	antagoniste	α γ δ	αTyr190 αCys192 αTyr198 δTrp57 γTrp55	C D	Chiara and Cohen, 1997
1998	MPA	[³ H]-Nicotine	agoniste	α γ	αTyr190 αCys192 αCys193 αTyr198 γTrp55	C D	Chiara et al., 1998
1999	MPA	[³ H]-d- Tubocurarine	antagoniste	α γ δ	γTyr111 γTyr117	E	Chiara et al., 1999
2000	MPA	[³ H]-DCTA	agoniste	α γ	αTyr190 αCys192 αCys193 αTyr198	C	Grutter et al., 2000
2000	MPA	[³ H]- Bz ₂ Choline	antagoniste	α γ δ	γLeu109 δLeu111	E	Wang et al., 2000
2003	MPA	[³ H]- TDBzcholine	antagoniste	α γ δ	αCys192 αCys193 αPro194 γLeu109 δLeu111	C E	Chiara et al., 2003

Tableau 2-2. Résidus du site ACh de nAChR de torpille identifiés par marquages chimiques. ^(a) MA = marquage d'affinité, MPA = marquage de photoaffinité, PC = pontage chimique. ^(b) Tous les antagonistes sont compétitifs. Les acides aminés probablement marqués sont indiqués entre parenthèse. D'après (Kotzyba-Hibert et al., 2004)

photoaffinité, réactifs de pontages et SCAM, voir **Tableau 2-2**) ont considérablement contribué à établir la localisation et la structure des sites ACh (pour revue voir (Arias, 2000)).

Le marquage d'affinité¹⁵ en premier lieu a permis, grâce à la présence du pont disulfure dans le site et au ligand réactif [³H]TDF (structure **Figure 2-21**), d'identifier la sous-unité α comme composante principale du site ACh (Weiland et al., 1979). Un analogue moins réactif, donc plus sélectif, le [³H]MBTA (structure **Figure 2-7**), a ensuite permis d'identifier les cystéines 192 et probablement 193 (boucle C) comme résidus alkylés. Ce lien covalent est protégeable par des ligands compétitifs mais ne s'établit cependant qu'une fois le pont disulfure réduit (Kao et al., 1984). Les mêmes résidus sont probablement marqués par la bromoacétylcholine (BrACh, structure **Figure 2-21**) sur le nAChR réduit de torpille (Damle et al., 1978) ou de type ganglionnaire (Brown & Kwiatkowski, 1976). Un nAChR constitutivement actif après application de DTT et de bromoacétylcholine a été ainsi obtenu, suggérant que la partie triméthylammonium est située en bonne position et en bonne orientation pour activer le récepteur. Ce pont disulfure est extrêmement conservé chez les sous-unités α du nAChR et doit donc jouer un rôle important dans la structure du site ACh. La structure de l'AChBP confirme la présence de ces cystéines vicinales (_{BP}C187 et _{BP}C188¹⁶) dans le site ACh et explique pourquoi pourquoi ce pont disulfure ne peut pas être réduit après liaison d'un agoniste (Damle & Karlin, 1980).

Les lophotoxines (voir structure **Figure 2-7**) sont des diterpènes naturels de corail qui inhibent de manière irréversible les nAChRs neuronaux et musculaires. Un analogue de [³H]lophotoxine a permis d'identifier l' α Tyr190 de la boucle C (Abramson et al., 1989) comme unique résidu spécifiquement alkylé par la toxine. Les auteurs proposent que cette tyrosine fasse partie du sous-site ammonium de l'ACh. Effectivement, dans l'AChBP, cette tyrosine (_{BP}Tyr185) fait partie de la cage aromatique qui entoure le groupement ammonium.

Le dérivé moutarde de [³H]acétylcholine (structure **Figure 2-21**) se couple de manière très faible (< 1%) mais significative au résidu α Tyr93 de la boucle A. Ce résultat

¹⁵ Le marquage d'affinité permet d'établir un lien covalent entre un ligand réactif et un acide aminé nucléophile du site de liaison. Un marquage radioactif du ligand permet ensuite d'identifier le résidu alkylé. Un inconvénient majeur est que le site doit contenir un résidu nucléophile, souvent présent chez les enzymes mais plus rare chez les récepteurs.

¹⁶ Numérotation AChBP

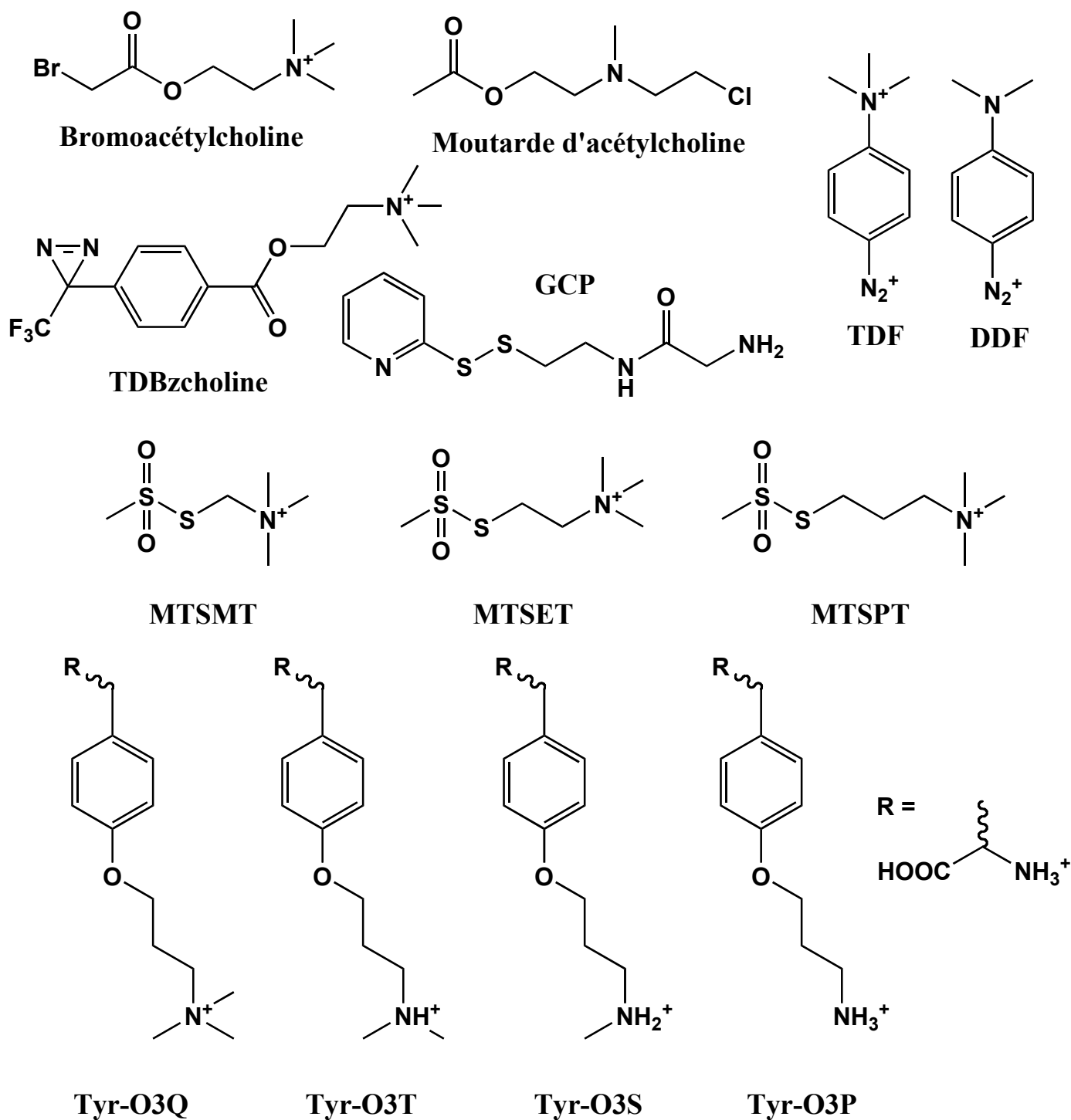


Figure 2-21: Structures de quelques sondes chimiques du site agoniste. La BrACh, la moutarde d'acétylcholine et le TDF sont des marqueurs d'affinité; la TDBzcholine et le DDF sont des marqueurs de photoaffinité; le GCP est un agent de couplage entre cystéine et résidu acide; les MTSMT, MTSET et MTSPT sont des sulfhydryles utilisés pour le SCAM; et les Tyr-O3Q, Tyr-O3T, Tyr-O3S et Tyr-O3P sont des acides aminés non naturels dérivés de la tyrosine et possédant une fonction amine primaire, secondaire, tertiaire ou un groupement ammonium.

permet de plus d'orienter la partie ammonium de l'acétylcholine vers ce résidu aromatique (Cohen et al., 1991). Cette tyrosine ($_{BP}Tyr89$) interagit effectivement de manière très rapprochée avec le groupement ammonium de la CCh chez l'AChBP.

Le marquage de photoaffinité a permis d'identifier la majorité des résidus du site agoniste. Le [3H]DDF (structure **Figure 2-21**), un analogue du marqueur d'affinité TDF, est un marqueur de photoaffinité conçu au laboratoire. Contrairement au marquage d'affinité, le marquage de photoaffinité permet de cartographier un site de liaison car la réaction de couplage est en théorie indépendante de la nature des acides aminés présents¹⁷. De plus, de part sa faible affinité pour le site ACh ($K_{app} = 1,5$ mM (Langenbuch-Cachat et al., 1988)), le [3H]DDF a véritablement permis de topographier le site agoniste. Le marquage de photoaffinité par transfert d'énergie développé au laboratoire (Goeldner & Hirth, 1980) a en effet permis d'obtenir des taux de couplages élevés et d'identifier ainsi huit résidus localisés sur trois boucles différentes de la sous-unité α : $\alpha Tyr93$ et peut-être $\alpha Trp86$ de la boucle A, $\alpha Trp149$ et peut-être $\alpha Tyr151$ de la boucle B ainsi que $\alpha Tyr190$, $\alpha Cys192$, $\alpha C193$ et $\alpha Tyr198$ de la boucle C (Dennis et al., 1988; Galzi et al., 1990). Le [3H]DDF marque aussi, mais dans une moindre mesure, les sous-unités γ et δ , et a permis ainsi d'élaborer un premier modèle de topologie du site ACh, à l'interface de deux sous-unités : une sous unité principale (α) et une sous-unité complémentaire (non- α) (Dennis et al., 1988). Tous les résidus identifiés de façon certaine se retrouvent dans la poche ACh chez l'AChBP. L' $\alpha Tyr151$ est une histidine chez AChBP ($_{BP}H145$) dont la chaîne latérale ne pointe pas vers le site, mais dont la chaîne principale est impliquée dans la formation du site. L' $\alpha Trp86$ ($_{BP}Trp82$) est par contre trop loin du site et n'intervient donc pas dans la liaison des ligands. Par ailleurs, le [3H]DDF a aussi été utilisé avec succès au laboratoire pour étudier les sites ACh de l'acétylcholinestérase (Kieffer et al., 1986; Schalk et al., 1994), de la butyrylcholinestérase (Nachon et al., 1998) et du récepteur muscarinique cholinergique (Autelitano et al., 1997).

Par la suite, l'antagoniste [3H]dTC (structure **Figure 2-7**), bien que très peu photosensible, a montré une incorporation au niveau des sous-unités α , mais aussi γ et δ , en accord avec le modèle proposé de sites à l'interface de deux sous-unités (Pedersen & Cohen, 1990). La [3H]dTC marque les mêmes résidus de la boucle C que le DDF, mais aussi des nouveaux résidus localisés sur les sous-unités complémentaires : $\gamma Tyr111$ et $\gamma Tyr117$ de la

¹⁷ Le principe du marquage de photoaffinité est décrit dans la partie I. du chapitre 3 (p 63).

boucle E ainsi que γ Trp55 et son homologue δ Trp57 de la boucle D (Chiara & Cohen, 1997; Chiara et al., 1999), confirmant ainsi pour la première fois au niveau moléculaire et à l'aide d'un couplage chimique que le site se situe à l'interface de deux sous-unités. De plus, la dTC se lie préférentiellement au site $\alpha\gamma$ ($K_d = 35$ nM) par rapport au site $\alpha\delta$ ($K_d = 1,2$ μ M) (Blount & Merlie, 1989; Pedersen & Cohen, 1990), montrant ainsi que la non-équivalence pharmacologique des deux sites est due à la contribution de la sous-unité complémentaire γ et δ (Chiara et al., 1999). Ces quatre résidus sont bien présents dans le site ACh de l'AChBP.

De la même manière, l'agoniste [3 H]nicotine (structure **Figure 2-6**) a été utilisé comme sonde de photoaffinité, bien que les taux de couplages soient extrêmement faibles ($\sim 1\%$). Néanmoins, les auteurs ont confirmé les quatre résidus de la boucle C marqués par le DDF (Middleton & Cohen, 1991) et le résidu de la sous-unité γ (γ Trp55) marqué par la dTC (Chiara et al., 1998).

Les mêmes auteurs ont par la suite synthétisé un nouvel antagoniste photosensible ([3 H]Bz₂Ch, structure **Figure 2-7**) dont le groupement photosensible benzophénone est espacé du groupement triméthylammonium par environ 9Å. Ce ligand marque préférentiellement les sous-unités γ et δ , mais aussi minoritairement α . Deux résidus de la boucle complémentaire E, à proximité du site ACh, ont été identifiés : la γ Leu109 et son homologue δ Leu111 (Wang et al., 2000). Ces deux résidus participent au « couvercle » du site ACh chez l'AChBP.

Un nouvel agoniste photosensible a ensuite été développé dans notre laboratoire : le [3 H]DCTA (structure **Figure 2-6**). Cet agoniste s'incorpore majoritairement sur la sous-unité α , marquant les mêmes résidus que le DDF sur la boucle C, mais aussi sur la sous-unité γ . De part son analogie structurale avec l'ACh, ce ligand a permis d'orienter la molécule d'ACh dans son site : les résidus aromatiques des boucles A et B ainsi que la sous-unité complémentaire établiraient des contacts avec la partie ammonium de l'ACh ou du DCTA, tandis que les cystéines vicinales interagiraient avec le groupement acétyl de l'ACh. Les Tyr190 et 198 seraient à l'interface des deux sous-sites (Grutter et al., 2000). Ce modèle est en accord avec la structure de l'AChBP complexée à la CCh.

Récemment, après la publication de la structure de l'AChBP, un nouvel antagoniste, le [3 H]TDBzcholine (structure **Figure 2-21**), a été utilisé. Cet antagoniste marque les mêmes résidus que le DDF sur la boucle C et les mêmes résidus que la Bz₂Ch sur la boucle E. Un nouveau résidu cependant est identifié sur la boucle C (α Pro194), en accord avec la structure de l'AChBP (Chiara et al., 2003).

Des pontages chimiques ont également été réalisés à l'aide de l'agent hétérobifonctionnel GCP (structure **Figure 2-21**) qui est capable de se coupler d'un côté à une cystéine, et de l'autre côté à un résidu acide. Ce composé se lie à l'hémicystine réduite 192-193 et à trois résidus acides localisés sur la sous-unité δ : δ Asp165, δ Asp180 et δ Glu182 de la boucle F (Czajkowski & Karlin, 1991; Czajkowski et al., 1993; Czajkowski & Karlin, 1995). Ces trois acides aminés se trouvent donc à moins de 9 Å du pont disulfure 192-193. Dans la structure de l'AChBP, le résidu équivalent ($_{BP}$ Tyr164) semble assez loin du site ACh, mais cette boucle F est mal résolue. De plus, cette boucle est très peu conservée dans la famille nicotinique et il est possible qu'elle adopte d'autres conformations suivant les sous-unités ou l'état d'activation du récepteur. On ne peut donc pas exclure une interaction entre ce résidu et les ligands cholinergiques.

Le SCAM a également été utilisé afin d'explorer le site de liaison de l'ACh. L'ensemble des résidus identifiés précédemment (boucles A, B, C et D) ont été mutés en cystéine, et la plupart conduisent à des récepteurs fonctionnels. Seules les mutations α Y198C et α Y93C génèrent des modifications importantes des EC50 de l'ACh, et les mutations α W149C et α Y190C (chez la torpille seulement) génèrent des nAChRs non fonctionnels (McLaughlin et al., 1995; Sullivan & Cohen, 2000). Les modifications covalentes avec des agents spécifiques des thiols ont montré que les résidus α W187, α V188, α F189, α Y190 et α P194 (boucle C) sont accessibles au solvant et contribuent à la liaison de l' α -BgTx (Spora et al., 1999) et que les résidus α Y93, α N94 (boucle A), α D195, α T196, α Pro197, α Y198, α D200, α I201 (boucle C), γ E57 (boucle D), α N107 et α L109 (boucle E) sont accessibles au solvant et contribuent à la liaison des agonistes (Sullivan & Cohen, 2000; Sullivan et al., 2002). L'accessibilité de tous ces résidus, sauf α D200C, est en accord avec la structure de l'AChBP. Il se peut cependant que α D200 soit accessible dans un autre état du récepteur (Sullivan et al., 2002).

Des amines primaires et quaternaires ont ensuite été introduites de manière covalente en différentes positions grâce à cette technique. Il est intéressant de noter que la modification MTSET (bras espaceur Ethyl) du mutant α Y198C, ainsi que la modification MTSPT (bras espaceur propyl) du même mutant dans une moindre mesure, génèrent un récepteur activé irréversiblement (voir structures **Figure 2-21**). Par contre, la modification

MTSMT (bras espaceur méthyl) de Y198C conduit à un récepteur inhibé de façon irréversible. Tous les autres mutants cystéines ont donné des récepteurs inhibés irréversiblement après l'addition des différents réactifs spécifiques des thiols. Ceci montre l'importance de la position et de l'orientation du groupement ammonium dans l'activation du nAChR (Sullivan & Cohen, 2000).

De manière surprenante, la dTC protège l'alkylation des résidus des boucles C, D et E, mais pas de la boucle A (Sullivan et al., 2002), ce qui est en accord avec la photoaffinité (Chiara & Cohen, 1997; Chiara et al., 1999) mais en désaccord avec la structure de l'AChBP (Brejc et al., 2001).

L'incorporation d'acides aminés non-naturels a permis également de fixer de manière covalente une fonction ammonium dans le site ACh. L'acide aminé synthétique Tyr-O3Q (structure **Figure 2-21**) introduit en position $\alpha 149$, à la place d'un tryptophane de la boucle B, génère un récepteur constitutivement actif, à condition que la sensibilité du récepteur soit accrue par l'introduction d'une seconde mutation Leu-9'→Ser dans le segment transmembranaire M2 de la sous-unité β (Zhong et al., 1998).

De manière inattendue, de nombreux résidus marqués par l'antagoniste DDF sont aromatiques. L'étude des interactions entre un récepteur synthétique aromatique et l'acétylcholine a permis de proposer l'établissement d'une liaison cation- π entre l'ammonium du ligand et les résidus aromatiques du nAChR (Dougherty & Stauffer, 1990). Des interactions cation- π ont par la suite été révélées par la structure atomique de l'AChE (Sussman et al., 1991). L'interaction cation- π est une force de liaison non covalente considérable (équivalente ou supérieure à une liaison hydrogène, voire supérieure à un pont salin suivant les études) dans laquelle le potentiel électrostatique négatif de la face π d'un noyau aromatique interagit avec les cations ((Dougherty, 1996), pour revue voir (Zacharias & Dougherty, 2002)). Cette interaction cation- π a été étudiée sur le nAChR notamment grâce à la méthodologie de l'incorporation d'acides aminés non naturels. Les tyrosines et les tryptophanes conservés du nAChR de torpille ont été mutés en dérivés non naturels possédant des substituants électroattracteurs ou électrodonneurs sur le noyau aromatique. Ces études ont montré que seul l' α Trp149 établit une liaison cation- π avec l'acétylcholine, en accord avec le fait que les tryptophanes sont plus à même d'établir des liaisons cation- π que les tyrosines ou phénylalanines. Cette interaction cation- π a été confirmée par la structure de l'AChBP. De façon surprenante, la nicotine ne semble pas, d'après ces études, établir des liaisons cation- π

avec ce Trp (Beene et al., 2002; Petersson et al., 2002). Cette interaction existe aussi dans les autres récepteurs de la famille à boucle cystéine (avec le tryptophane homologue) et chez les récepteurs de la famille du glutamate (pour revue (Zacharias & Dougherty, 2002)). De manière intéressante, le récepteur à la sérotonine MOD-1 de *C.elegans* possède une Tyr180 à la place du Trp149, mais un Trp226 à la place de l' α Tyr192 très conservée dans la famille. Le site d'interaction cation- π est situé dans ce cas avec le Trp226, soit à environ 9 Å de la Tyr180, ce qui montre qu'un même ligand peut adopter des orientations différents suivant le récepteur et tout de même conduire à l'activation de celui-ci (Mu et al., 2003).

Plus récemment, des dérivés d'amines tertiaire, secondaire et primaire de Tyr-O3Q (Tyr-O3T, Tyr-O3S et Tyr-O3P, voir structures **Figure 2-21**) ont montré que seules les formes protonées de Tyr-O3T et Tyr-O3S peuvent activer le récepteur. Par ailleurs, le pKa de ces amines est bien plus bas dans le site ACh qu'en solution, montrant que le site agoniste produit un micro-environnement local hydrophobe (Petersson et al., 2002).

D'autres incorporations d'acides aminés synthétiques ont montré l'importance du groupement hydroxyle de l' α Tyr93 et du noyau aromatique de l' α Tyr198 dans la liaison et l'efficacité des agonistes (Nowak et al., 1995). Effectivement, seul le groupement hydroxyle de la $_{BP}$ Tyr89 établit des interactions avec la CCh et la nicotine et seuls des contacts aromatiques existent avec la $_{BP}$ Tyr192.

La mutagenèse dirigée, couplée à l'électrophysiologie, a permis d'explorer le rôle de ces résidus identifiés par marquage chimique. Cependant, du fait qu'une mutation à un endroit de la protéine peut générer des perturbations à distance par phénomène allostérique, les conclusions tirées de l'analyse de ces mutants peuvent être erronées (Spivak, 1995). Les expériences de mutagenèse dirigée sont nombreuses et ne seront décrites ici que celles ayant permis l'identification de nouveaux partenaires de l'interaction ligand-récepteur.

Une nouvelle boucle, que j'appellerai boucle G dans ce manuscrit, a été identifiée par mutagenèse dirigée. Une élégante dissection moléculaire, à l'aide de chimères γ - δ , de l'origine de la sélectivité de différents antagonistes et agonistes pour chacun des deux sites, a permis d'identifier quatre régions impliquées dans la liaison de ces ligands: γ Lys34/ δ Ser36 (boucle G), γ Glu57/ δ Asp59 (boucle D), γ Ser111/ δ Tyr113, γ Cys115/ δ Tyr117, γ Ile116/ δ Val118 et γ Tyr117/ δ Thr119 (boucle E), γ Phe172/ δ Ile178 et γ Ser161/ δ Lys163 (boucle F) (Sine, 1993; Prince & Sine, 1996). La boucle G est à proximité du site dans l'AChBP, mais pas directement en contact avec les ligands. Il semble cependant

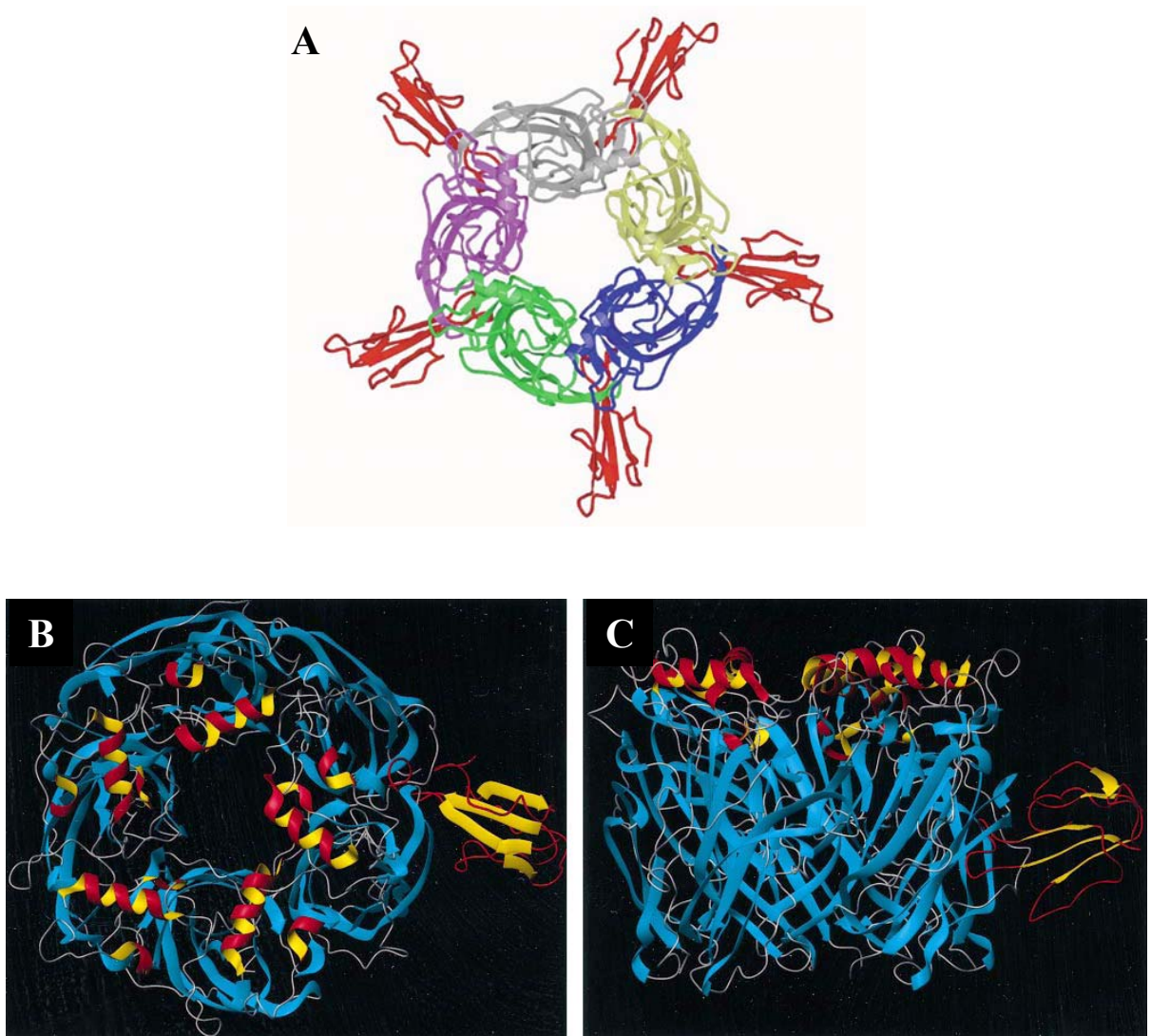


Figure 2-22: Modèles structuraux du complexe α -bungarotoxine - AChBP ou nAChR $\alpha 7$. (A) Modèle basé sur la structure RMN d'un complexe entre un peptides de synthèse de 13 résidus (HAP) et l' α -bungarotoxine (structure atomique 1HC9). Ce 13-mer a ensuite été superposé à la boucle C de l'AChBP. D'après (Harel et al., 2001). (B) et (C) Modèle d'interaction entre le nAChR $\alpha 7$ et l' α -Bgtx. Le nAChR $\alpha 7$ a été modélisé d'après la structure de l'AChBP. La toxine a été positionnée dans ce modèle d'après les interactions de neuf paires de résidus identifiées par des expériences de mutagenèse dirigée. D'après (Fruchart-Gaillard et al., 2002).

que ces résidus influent sur la sélectivité des ligands uniquement sous l'état de repos du récepteur (Prince & Sine, 1996).

Les toxines ont également été des outils précieux dans la détermination des acides aminés impliqués dans leur reconnaissance. Les neurotoxines α sont des polypeptides curarisants à trois doigts (voir structure **Figure 2-7**) qui paralysent les muscles squelettiques en se fixant de manière très forte (10^{-9} à 10^{-11} M) au site agoniste. Cette haute affinité est liée à une constante de dissociation très lente qui rend la liaison quasi-irréversible (pour revue voir (Nirthanan & Gwee, 2004)). La structure de plusieurs toxines a pu être déterminée par RMN et cristallographie aux rayons X. Plusieurs approches ont été entreprises pour étudier l'interaction des toxines avec le récepteur. Le marquage de photoaffinité notamment a permis d'identifier les sous-unités α , γ et δ comme composantes de l'interaction. La mutagenèse dirigée sur les toxines et sur le récepteur permet de faire une analyse différentielle de cycles thermodynamiques et d'identifier ainsi des paires d'interactions à courte distance. Le site primaire d'interactions a été notamment localisé dans le segment E172 – F205 de la sous-unité α , autour de la boucle C. Des études structurales par RMN et cristallographie de complexes entre les toxines et des peptides synthétiques correspondants à ce segment ont permis d'affiner cette interaction (pour revue voir (Nirthanan & Gwee, 2004)). La superposition de la structure de ces complexes avec la structure de l'AChBP a permis de modéliser cette interaction (Harel et al., 2001; Fruchart-Gaillard et al., 2002; Moise et al., 2002). Ces modèles s'accordent entre-eux pour montrer que cinq toxines peuvent théoriquement se fixer au nAChR $\alpha 7$ ou à l'AChBP. Le doigt II de la toxine établirait les principales interactions avec la boucle C du récepteur, empêchant donc les agonistes de pénétrer dans le site (**Figure 2-22**).

Il est également intéressant de connaître les déterminants moléculaires de la résistance des serpents à leur propre venin. Les toxines, afin d'atteindre un large spectre d'espèces très différentes, doivent s'attaquer à une cible bien conservée tout au long de l'évolution. Par ailleurs, cette cible doit être indispensable à la survie de l'organisme afin que la toxine exerce une action létale. Les récepteurs musculaires de l'acétylcholine sont par conséquent des cibles privilégiées pour ces toxines, leur inhibition entraînant la mort de l'individu par asphyxie. Néanmoins, si la structure du nAChR est conservée entre les espèces, pourquoi n'en serait-il pas de même pour les nAChRs de serpent ? Une étude menée sur le nAChR musculaire de cobra égyptien *Naja haje* a montré que sa structure primaire présente

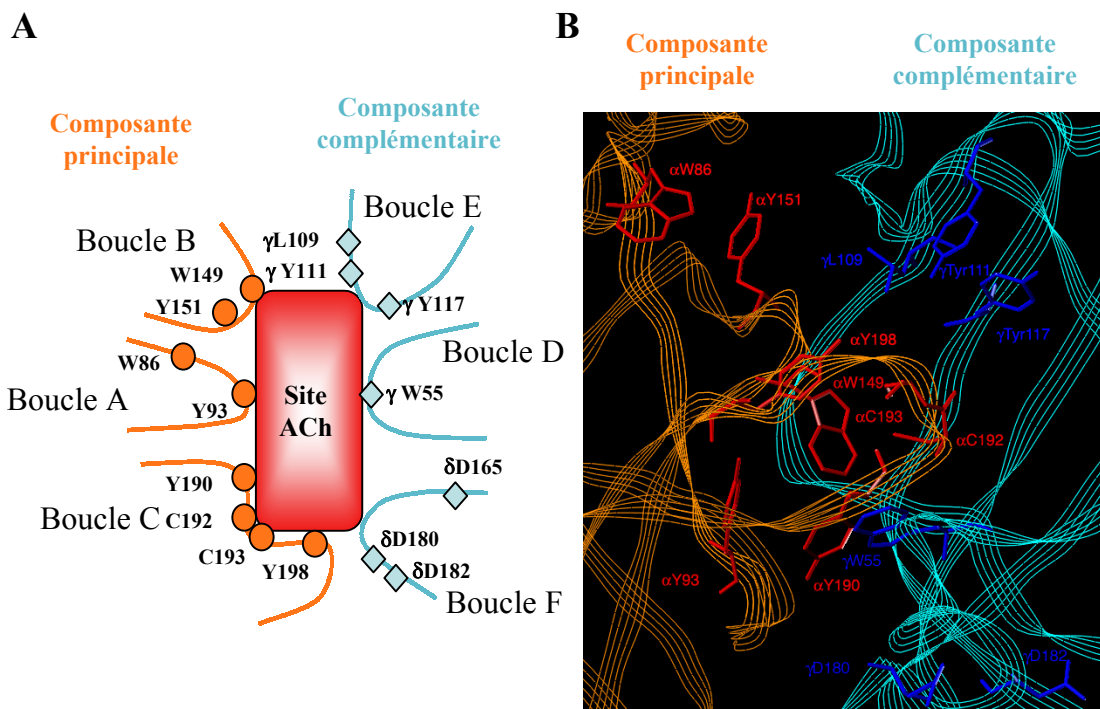


Figure 2-23 : Acides aminés du site ACh du nAChR de torpille. (A) acides aminés identifiés par marquages chimiques sur le nAChR de torpille avant la publication de l'AChBP et permettant l'établissement de ce modèle à 6 boucles. Les boucles de la composante principale sur la sous-unité α (boucles A, B et C) sont représentées en orange et les boucles de la composante complémentaire sur γ et δ (boucles D, E et F) sont représentées en bleu. **(B)** Modèle du site ACh du nAChR de torpille construit par homologie d'après la structure de l'AChBP. Tous les résidus identifiés par marquages chimiques se retrouvent dans - ou à proximité - du site ACh. D'après (Kotzyba-Hibert et al., 2004).

une grande homologie de séquence avec les autres espèces, donc à priori une structure identique, en accord avec la théorie de l'évolution. De manière assez astucieuse, une simple mutation ponctuelle (N189, équivalente à la position Y190 chez *Torpedo*) introduit un site de glycosylation à proximité du site agoniste, empêchant la fixation de gros polypeptides telles les toxines mais pas de petits ligands telle l'ACh et confère ainsi la résistance moléculaire du nAChR de cobra aux toxines (Takacs et al., 2001).

En conclusion, les marquages covalents et la mutagenèse dirigée (traditionnelle ou non) ont grandement contribué à établir des modèles du site agoniste du nAChR. La grande majorité de ces résultats est en accord avec la structure cristallographique de l'AChBP, protéine homologue au domaine de liaison du récepteur, prouvant ainsi la force des marquages chimiques des protéines lorsqu'une structure cristallographique manque (**Figure 2-23**).

Les sites agonistes sont donc à l'interface de deux sous-unités, $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$ dans le cas du nAChR de torpille. Ils sont constitués :

- d'une composante principale constituée de trois boucles sur la sous-unité α : la boucle A (α Tyr93), la boucle B (α Trp149 et α Tyr151) et la boucle C (α Tyr190, α Cys1925, α Cys193, α Pro194 et α Tyr198)
- d'une composante complémentaire constituée de quatre boucles localisées sur les sous-unités γ et δ : la boucle G (γ Lys34/ δ Ser36), la boucle D (γ Trp55/ δ Trp57 et γ Glu57/ δ Asp59), la boucle E (γ Leu109/ δ Leu111, γ Tyr111/ δ Arg113, γ Tyr117/ δ Thr119 et γ Leu119/ δ Leu121) et la boucle F (γ Asp174/ δ Glu180, γ Glu176/ δ Glu182 et γ Asp177/ δ Ala183).

A noter que, dans l'AChBP, la boucle G et certains composants de la boucle F sont à proximité du site, mais pas directement en contact avec les ligands. Les modifications structurales subies par le nAChR lors de l'ouverture et fermeture du canal pourraient toutefois rapprocher ces domaines du site agoniste.

Cette localisation à l'interface des sous-unité $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$ confèrent à ses sites une non-équivalence pharmacologique. Le site $\alpha\delta$ du nAChR musculaire de souris lie par exemple l' α -conotoxine M1 avec une sélectivité d'environ 10 000 fois (Sine et al., 1995) alors que cette sélectivité est inversée (10 fois) chez le nAChR de torpille (Papineni et al., 2001). Le site $\alpha\gamma$ des nAChRs musculaire et de torpille lie préférentiellement la dTC (sélectivité 35 à 1000) et l'épipatidine (sélectivité 50 à 300) par exemple (Blount & Merlie,

1989; Chiara & Cohen, 1997; Prince & Sine, 1998; Song et al., 2003). Cette non-équivalence pharmacologique des deux sites est donc le reflet de la non-équivalence structurale de la sous-unité complémentaire, en l'occurrence γ et δ . D'autres ligands ne différencient pas les deux sites agonistes ; c'est le cas de l' α -BgTx (Weber & Changeux, 1974) ou de l'ACh, du moins sous l'état désensibilisé du récepteur (Neubig & Cohen, 1979; Edelstein et al., 1997). Le rôle fonctionnel et physiologique de la présence de deux sites pharmacologiquement différents n'est pas encore éclairci.

IV) Dynamique du nAChR

Francis Crick était convaincu, lors des balbutiements de la biologie structurale, qu'une fois les structures des macromolécules biologiques résolues, leurs fonctions ou mécanismes deviendraient immédiatement évidents. L'étonnement fût général lorsqu'on se rendit compte que ce n'était, non seulement pas nécessairement le cas, mais plutôt souvent le contraire.

A) Le nAChR : une protéine allostérique

Une caractéristique fondamentale de la fonction des récepteurs canaux ionotropes est la rapidité avec laquelle ils s'ouvrent pour permettre le passage des ions à travers l'inhospitalière membrane. Cette ouverture, dans le cas du nAChR, fait suite à la liaison d'agonistes dans les sites ACh. L'application prolongée d'agoniste conduit ensuite le récepteur dans un état réfractaire à toute stimulation : on parle de phénomène de désensibilisation.

La nature multimérique de ces canaux leur fournit les bases nécessaires à un tel bouleversement structural. Tous ces récepteurs canaux possèdent plusieurs sites de liaison, et les sites agonistes sont notamment à environ 50 Å du canal, ce qui suggèrent intuitivement la mise en place de phénomènes allostériques.

Une avancée majeure dans l'étude des canaux ioniques est venue avec le développement de la technique de patch-clamp par Neher et Sakmann en 1976 (Neher & Sakmann, 1976). Les canaux ont été les premières protéines à être étudiées au niveau monomoléculaire et restent aujourd'hui encore, et de loin, le système le plus sensible pour lequel on peut suivre le comportement cinétique d'une seule macromolécule.

- Cinétiques d'ouverture-fermeture du canal

La première étape nécessaire à la détermination des cinétiques d'ouverture et de fermeture d'un canal est de mesurer séparément la liaison de l'agoniste au récepteur fermé et l'action d'ouverture du canal de cet agoniste lié sur le récepteur (Colquhoun, 1998). Ceci peut être résolu par mesure de courants sur canaux uniques, car les mesures sur cellule entière ne permettent pas de distinguer ces deux phénomènes. Les cinétiques

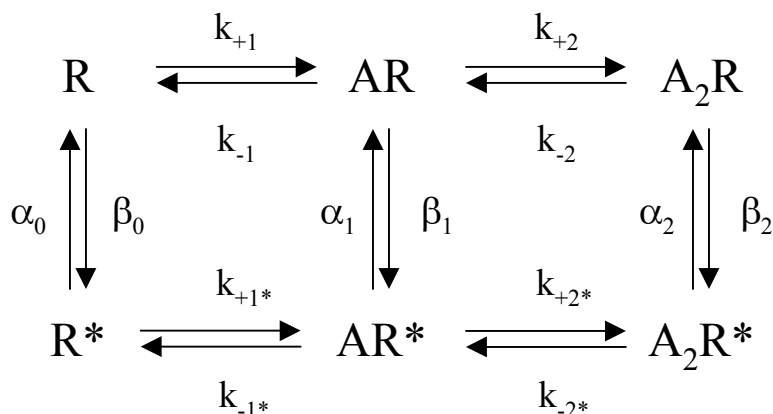


Figure 2-24 : Modèle d'activation du récepteur. Dans ce modèle, le récepteur (R) peut lier un ou deux agonistes (A) et peut s'ouvrir (R*) sans agoniste, ou avec un ou deux agonistes liés. Les deux sites agonistes sont identiques dans l'état non ligandé du récepteur, mais il est possible que, dans l'état fermé, l'affinité pour le deuxième événement de liaison (K_2) soit différente de celle du premier événement de liaison (K_1). Si $K_2 > K_1$, on a un phénomène de coopérativité de liaison. Toutefois, même si $K_2 = K_1$, on peut observer au niveau macroscopique une coopérativité de la réponse (nombre de Hill > 1) qui traduit une transition concertée vers l'état ouvert. L'efficacité d'ouverture $E = \beta/\alpha$ est plus grande sous l'état diligandé ($E_2 \approx 30$ pour l'ACh) que sous l'état monoligandé ($E_1 \approx 0,05$ pour l'ACh) et est quasi improbable sous l'état non ligandé ($E_0 \approx 10^{-5} - 10^{-6}$).

d'interconversions de l'état de repos fermé (R) vers l'état actif ouvert (A ou R*) ont été étudiées pour la première fois par patch clamp en configuration cellule attachée. Dans ces conditions, il est possible d'enregistrer des événements unitaires d'ouverture et de fermeture de quelques canaux. Les constantes cinétiques d'ouverture (β) et de fermeture (α) ont pu ainsi être calculées : $\beta = 30\,000\text{ s}^{-1}$, $\alpha = 700\text{ s}^{-1}$, voir **Figure 2-24** (Colquhoun & Sakmann, 1985)

Afin de s'affranchir des problèmes liés aux temps de diffusion des agonistes dans le milieu, des agonistes cagés¹⁸ ont été synthétisés. L'application de ce ligand cagé, à l'obscurité, ne conduit pas à l'activation du récepteur. Une source lumineuse intense permet de démasquer rapidement la fonctionnalité du ligand et donc de générer un saut très rapide de concentration en agoniste. La lumière permet ainsi de photoréguler l'activité du nAChR et de contrôler simultanément la libération de l'agoniste et l'enregistrement des données. Les valeurs obtenues (Matsubara et al., 1992) sont assez proches de celles déterminées par Colquhoun (Colquhoun & Sakmann, 1985).

La conductance du canal est indépendante de la nature des agonistes et du nombre d'agonistes liés au récepteur. On estime que 10^6 à 10^7 ions transitent par canal par seconde (Changeux et al., 1984).

Tous les récepteurs de la famille à boucle cystéine possèdent plusieurs sites de liaison des agonistes (de 2 à 5) et la probabilité d'ouverture du canal augmente en fonction du taux d'occupation des sites (probabilité traduite par l'efficacité $E = \beta/\alpha$, voir **Figure 2-24**). Pour le nAChR musculaire, la courbe dose-réponse des agonistes apparaît selon une sigmoïde, avec un nombre de Hill proche de 2, suggérant que deux agonistes sont nécessaires pour activer le récepteur et qu'il existe une coopérativité entre les deux sites. Un mécanisme mettant en jeu la liaison séquentielle de deux molécules d'agonistes permet de décrire ce phénomène, l'ouverture du canal étant possible à partir de l'état monoligandé ou diligandé (**Figure 2-24**). L'ouverture du canal peut se produire également sans ligand bien que, à part pour certains mutants (Ohno et al., 1995; Bertrand et al., 1997; Grosman & Auerbach, 2000), de tels événements soient trop rares pour être visualisés ($E_0 \approx 10^{-5}$ - 10^{-6}). L'ACh est un agoniste très efficace du nAChR musculaire, puisque $E_2 \approx 30$ (soit une réponse maximum proche de 1 (97%) pour un récepteur diligandé). La choline par contre, qui est un agoniste

¹⁸ Une molécule cagée est une biomolécule dont l'activité et la fonctionnalité sont masquées par un groupement photolabile, la réaction photochimique permettant de transformer un composé biologiquement inerte en composé actif (Loudwig et al., 2002).

partiel, a une efficacité bien moindre puisque $E_2 \approx 0,05$, ce qui se traduit par une cinétique d'ouverture du canal 200 fois plus faible.

Etant donné que les ligands se lient et se dissocient continuellement du récepteur, il est difficile de suivre l'effet de chaque événement de liaison individuellement. Une stratégie a été employée avec succès sur les récepteurs canaux aux nucléotides cycliques : les auteurs ont accroché de manière covalente un analogue photosensible du cGMP dans son site de liaison, et ont étudié de manière isolée les récepteurs avec un, deux, trois ou quatre agonistes attachés. Cette étude a permis de montrer que les récepteurs monoligandés ont une probabilité d'ouverture très faible (10^{-5}), proche de celle des récepteurs sans ligand. Les récepteurs di- et triligandés s'ouvrent avec des probabilité plus importantes (10^{-2} et 0,33 respectivement) et les récepteurs quadriligandés sont ouverts la majeure partie du temps. De manière frappante, plusieurs sous-états conductants ont été mis en évidence, notamment avec les formes di et triligandées, pouvant correspondre à plusieurs conformations ouvertes du récepteur (Ruiz & Karpen, 1997).

Afin que l'ACh puisse déplacer aussi rapidement l'équilibre vers l'état ouvert du récepteur, il faut que son affinité pour l'état ouvert soit 1000 à 5000 fois supérieure à celle pour l'état de repos (Grosman & Auerbach, 2001). L'affinité de l'ACh pour les états fermés est plus facile à mesurer que celle pour l'état ouvert, car elle peut être faite par des tests classiques de liaison, bien que l'état de repos R soit également furtif dans le cas d'un agoniste. L'affinité pour l'ACh sous l'état de repos a été mesurée entre 50 et 100 μM sur le nAChR de torpille (Boyd & Cohen, 1980). Afin de mesurer l'affinité de l'ACh sous l'état actif très furtif, des mutations ont été générées afin d'augmenter la vitesse d'ouverture du canal, de diminuer sa vitesse de fermeture, le tout sans changer l'affinité de l'ACh pour son site. Ces analyses ont montré que sur le nAChR diligandé, l'ACh se dissocie 2 500 fois plus lentement sous l'état ouvert que sous l'état fermé, sans changer sa vitesse d'association. L'affinité de l'ACh sous l'état actif serait donc 2 500 fois plus grande que sous l'état de repos (Grosman & Auerbach, 2001). De manière surprenante, d'autres études faites sur le récepteur GABA_C tendraient même à montrer que l'agoniste est bloqué dans son site pendant que le canal est ouvert (Chang & Weiss, 1999).

- Désensibilisation du nAChR

Katz et Thesleff avaient observé que l'application prolongée d'agonistes conduit à une diminution réversible, temps et concentration dépendante, de la réponse de la plaque motrice: c'est le phénomène de désensibilisation (Katz & Thesleff, 1957).

La désensibilisation est un terme général qui décrit une diminution ou une perte de la réponse biologique consécutive à une stimulation prolongée ou répétée. Au niveau microscopique, ceci se traduit par une accumulation des récepteurs dans un état réfractaire non-conductant. Le fait que les nAChRs reconstitués dans des bicouches lipidiques subissent aussi ce phénomène de désensibilisation prouve que ce processus est intrinsèque à la protéine (Ochoa et al., 1989), bien que de nombreux facteurs puissent moduler ce phénomène¹⁹. Une fois l'agoniste retiré du milieu, le récepteur peut retourner dans son état de repos initial, et ceci indépendamment du type d'agoniste et de sa concentration (voir cependant (Reitstetter et al., 1999)). On peut cependant observer un retour incomplet à l'état initial, particulièrement après un traitement chronique, qui peut refléter une accumulation durable de récepteurs dans un ou plusieurs états désensibilisés, ou encore qui peut être dû à une perte irréversible de récepteurs à la surface de la cellule (Simasko et al., 1986). A noter toutefois que la prise chronique de nicotine peut conduire, de manière inattendue, à une augmentation de la réponse à l'ACh ainsi qu'à une désensibilisation plus lente des nAChRs. Cette régulation serait plutôt due à un nouvel état des récepteurs qu'à une augmentation du nombre de récepteurs à la surface des cellules (Buisson & Bertrand, 2002).

L'équipe du Professeur Changeux, dès les années soixante-dix, a utilisé un ligand fluorescent afin de mettre en évidence les réorganisations structurales du récepteur nicotinique. L'agoniste fluorescent Dansyl-C6-Choline (structure **Figure 2-6**) a ainsi permis d'étudier de manière approfondie la désensibilisation du nAChR. Les variations de fluorescence émises par la Dns-C₆-Ch ont mis en évidence deux états désensibilisés différents : un état de désensibilisation rapide (Etat intermédiaire I, ordre de la ms) et un état de désensibilisation lente (Etat désensibilisé D, ordre de la s) qui correspondent à un canal fermé (Heidmann & Changeux, 1979; Heidmann & Changeux, 1980; Heidmann et al., 1983). L'affinité de la Dns-C₆-Ch évolue au cours de la désensibilisation du nAChR: le nAChR passerait d'un état de faible affinité (~ 50 µM) à un état transitoire d'affinité intermédiaire (~

¹⁹ Les différents facteurs modulant la désensibilisation du nAChR sont abordés dans la partie IV-B de ce chapitre (p 49) (pour revue voir (Pereira et al., 2002)).

1 μM) puis à un état de haute affinité ($\sim 3 \text{ nM}$) pour la Dns- C_6 -Ch. Cette augmentation de l'affinité au cours de la désensibilisation apporte notamment une explication au paradoxe généré par l'énorme différence entre l'affinité de l'ACh (nM, mesurée initialement sous l'état D) et l'efficacité de cet agoniste sur le nAChR (μM , expériences d'électrophysiologie).

Par ailleurs, ces expériences de fluorescence ont montré pour la première fois la préexistence de 20% des récepteurs sous l'état désensibilisé de haute affinité pour les nAChRs de torpille (Heidmann & Changeux, 1979). Par la suite, des expériences de liaison de [^3H]nicotine ont montré que 40 % des récepteurs $\alpha 4\beta 2$ préexistaient sous l'état désensibilisé. Pour les nAChRs $\alpha 7$, la proportion de récepteurs préexistant sous l'état D semble très faible (Corringer et al., 1998). Cependant, il faut être prudent avec ces valeurs car l'état de repos a une trop faible affinité et un temps de vie trop court pour être étudié de manière fiable par des expériences de liaison.

La désensibilisation : un phénomène physiologique ? Le temps de résidence d'un neurotransmetteur dans la synapse est très dur à mesurer ou à modéliser, car de nombreux facteurs entrent en jeu, notamment le nombre de molécules délivrées dans la synapse, le volume et la géométrie de celle-ci, la distribution et l'affinité des sites de liaison (des récepteurs, transporteurs et enzymes)... Néanmoins, de récentes modélisations ont permis d'estimer que le temps moyen de résidence des neurotransmetteurs dans la synapse ($\sim 100 \mu\text{s}$) est généralement inférieur au temps nécessaire au nAChR pour atteindre un état désensibilisé (Clements, 1996). La désensibilisation du nAChR a-t-elle donc une signification physiologique? Katz et Thesleff parlaient déjà de processus non-physiologique inhérent à la technique d'étude (Katz & Thesleff, 1957). Il est à noter que tous les nAChRs désensibilisent, mais il n'en est pas de même pour tous les autres récepteurs canaux (certains récepteurs GABA par exemple ne désensibilisent pas, ou alors très lentement et de manière incomplète).

Toutefois, pour les récepteurs qui désensibilisent rapidement (comme $\alpha 7$) ou pour ceux qui ont une haute affinité pour l'ACh (comme $\alpha 4\beta 2$), une désensibilisation peut avoir lieu pendant les périodes de stimulations répétées (Jones & Westbrook, 1996). Par ailleurs, si l'ACh est présente à faible concentration, les nAChRs ne vont pas s'ouvrir et rentrer dans un état désensibilisé. Ce pourrait donc être un mécanisme de sécurité au cas où l'hydrolyse du neurotransmetteur soit défailante (Dudel & Franke, 1995). De plus, étant donné que certains nAChRs sont perméables au Ca^{2+} , et que le Ca^{2+} est cytotoxique, la désensibilisation des nAChRs pourrait également jouer un rôle protecteur lorsqu'une

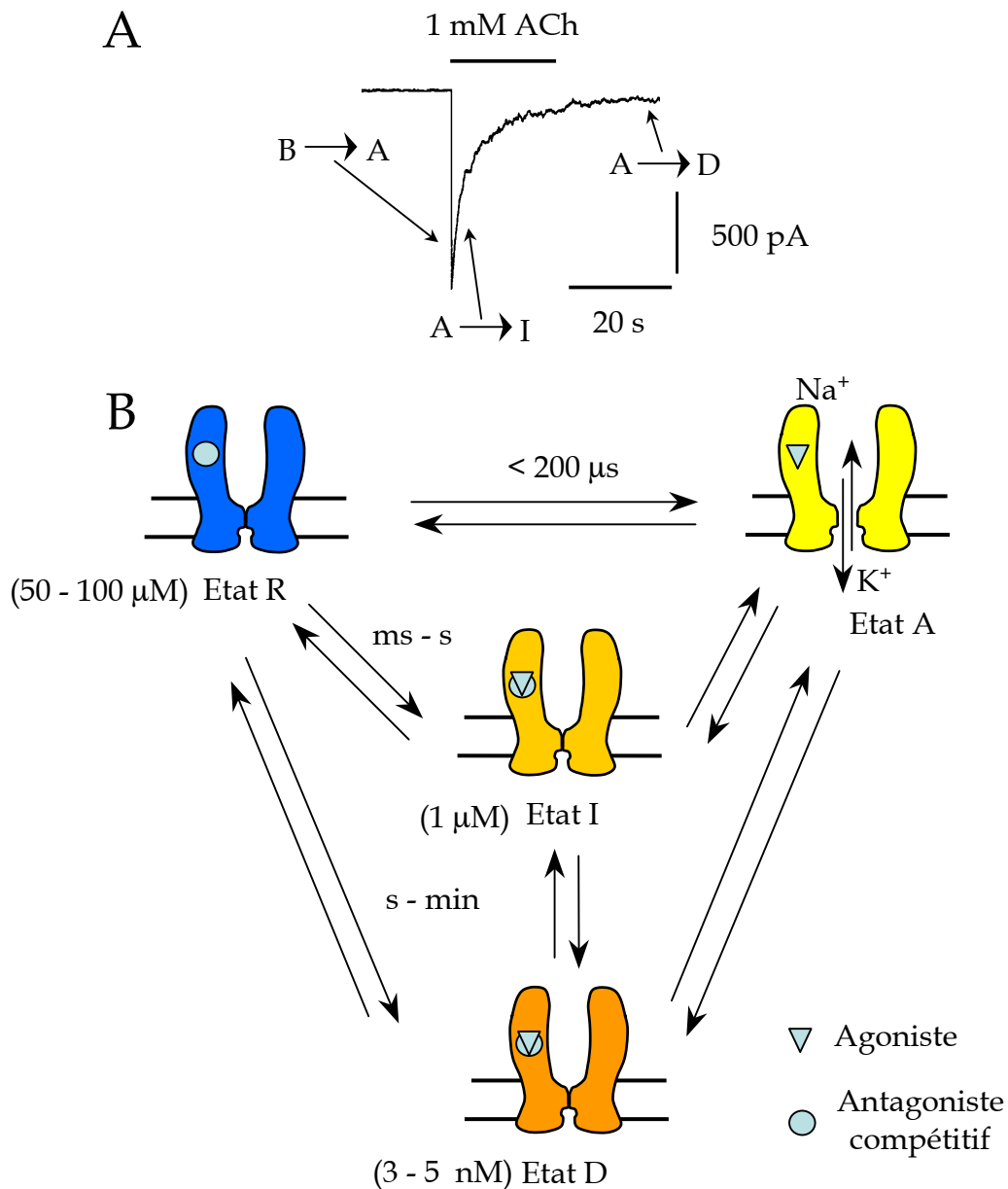


Figure 2-25. Propriétés fonctionnelles du récepteur nACh. (A) Enregistrement électrophysiologique, en configuration cellule entière, d'un courant entrant suite à l'application d'ACh (1 mM). L'application prolongée d'ACh provoque la désensibilisation (passage sous les états I et D). (B) Modèle minimal à 4 états interconvertibles. L'état R est l'état de repos ou activable; l'état A est l'état actif (état perméant aux ions); les états I (intermédiaire) et D (désensibilisé) sont imperméants aux ions. Les valeurs entre parenthèses représentent les affinités de l'ACh pour le site agoniste dans les différents états du récepteur. Les temps indiqués représentent les temps moyens d'isomérisation entre les états. D'après (Heidmann et Changeux, 1980 ; Galzi et Changeux, 1995).

molécule exogène vient perturber le fonctionnement de la synapse (par exemple la nicotine, ou les inhibiteurs d'AChE utilisés pour traiter la maladie d'Alzheimer) (Quick & Lester, 2002).

- Modèles allostériques

Toutes ces expériences ont permis d'établir un modèle minimal à quatre états pour le récepteur nicotinique, décrit dans la **Figure 2-25B**. Ces trois états fermés (R, I et D) et l'état ouvert (A) sont tous en équilibre entre eux.

Deux grandes théories ont été proposées pour décrire le fonctionnement de protéines allostériques : le modèle concerté de Monod-Wyman-Changeux (MWC) et le modèle séquentiel de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF)

Le modèle concerté de Monod-Wyman Changeux (MWC) a été établi au départ (1965) pour décrire de manière qualitative et quantitative les propriétés paradoxales de certaines enzymes, et notamment les interactions coopératives entre le substrat et un ligand modulateur (Changeux & Edelstein, 1998). Ces observations ont conduit au concept de l'allostérie (du grec *allos* autre, et *stereon* espace, relief) qui reflétait au départ une interaction indirecte via un site de régulation distinct. Le terme d'allostérie est maintenant devenu général et peut être utilisé pour refléter plusieurs phénomènes distincts.

Le modèle MWC repose sur 4 hypothèses: (1) les protéines allostériques sont en général des oligomères constitués d'un nombre défini de sous-unités identiques qui occupent des positions équivalentes et, en conséquence, possèdent au moins un axe de symétrie de rotation; (2) l'oligomère peut exister spontanément sous deux états discrets et interconvertibles ($T \leftrightarrow R$) qui diffèrent par leurs énergies d'interactions entre sous-unités (contrainte quaternaire) mais conservent la symétrie moléculaire, le passage de l'état i à j se faisant selon un schéma de « tout ou rien »; (3) l'affinité et l'activité des sites de liaison peuvent varier selon l'état, et un ligand va stabiliser l'état pour lequel il a le plus d'affinité; (4) en absence de ligand, l'équilibre $T \leftrightarrow R$ est caractérisé par une constante d'isomérisation $L = (T) / (R)$, et la modification de l'équilibre conformationnel par un ligand suffit à générer un phénomène coopératif (Monod et al., 1965). Ce modèle est schématisé **Figure 2-26**.

Le nAChR, bien que possédant seulement un axe de pseudo-symétrie (sauf pour les nAChRs homopentamériques tels $\alpha 7$, $\alpha 8$ ou $\alpha 9$), est remarquablement bien décrit par

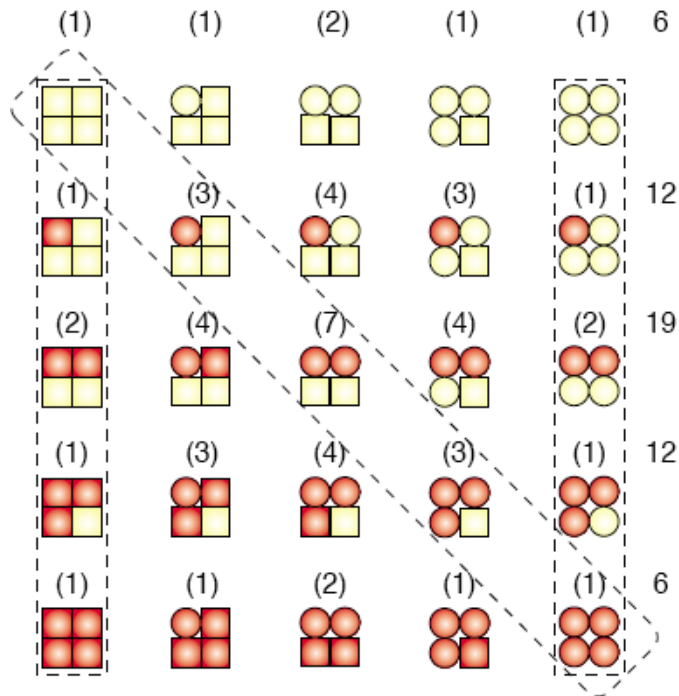


Figure 2-26: Modèle allostérique général. Ce modèle général rassemble le modèle concerté (encadrés verticaux) et le modèle séquentiel (encadré diagonal). Dans ce modèle général, chaque sous-unité peut lier un ligand (rouge) et subir un changement conformationnel (de carré à cercle). En assumant un axe de symétrie d'ordre 4, le nombre de configurations différentes potentiellement atteintes pour chaque état de la protéine est indiqué entre parenthèses, et le nombre total de conformations possibles suivant le taux d'occupation des sites est indiqué à droite. D'après (Karpen and Ruiz, 2002).

ce modèle concerté, notamment concernant son apparente synchronisation d'ouverture. Ce modèle explique aussi le fait qu'un récepteur puisse spontanément s'ouvrir en absence de ligand (Grosman & Auerbach, 2000). Il éclaire également sur le fait qu'un antagoniste devienne un agoniste sur un récepteur au phénotype particulier, tout simplement en stabilisant un état désensibilisé conductant (Bertrand et al., 1997).

Le modèle séquentiel de Koshland-Nemethy-Filmer (KNF) est basé sur l'hypothèse que la liaison d'un ligand dans son site entraîne un changement conformationnel d'une seule sous-unité. Un effet coopératif de liaison (positif ou négatif) est alors généré par modification de l'interface entre les sous-unités (Koshland et al., 1966). Bien que ce modèle génère moins d'états conformationnels de la protéine que le modèle concerté (voir **Figure 2-26**), il nécessite plus de paramètres pour le décrire et a donc été moins utilisé.

Ce modèle décrit bien aussi certaines propriétés du nAChR, notamment le fait que l'on puisse observer plusieurs sous-conductances, mais ne permet pas d'expliquer des changements synchrones dans la structure quaternaire, ni l'activation spontanée en absence de ligand. Bien que des états sous-conductants n'aient pas été identifiés sans ambiguïté sur le nAChR, ils l'ont été sur d'autres canaux (Karpen & Ruiz, 2002).

Le modèle allostérique général autorise le fait que la liaison d'un ligand sur une sous-unité augmente la probabilité de changement conformationnel de cette sous-unité ou d'une sous-unité voisine, mais que ces changements conformationnels peuvent avoir lieu également en absence de ligand (Eigen, 1968). Bien que conceptuellement simple, ce modèle génère un nombre impressionnant de conformations différentes (voir **Figure 2-26**) et est donc difficilement utilisable. Il permet pourtant de réconcilier les modèles concertés et séquentiels. Il est important de noter cependant que, de manière modeste, Monod et al. déclaraient apporter une première approximation simplifiée des systèmes biologiques et montrer la relation entre la symétrie et la fonction (Monod et al., 1965).

B) Régulations des équilibres conformationnels

Chaque type de sous-unité confère au nAChR des caractéristiques de liaison et/ou de fonction qui lui sont propres. Cette fonction peut ensuite être régulée de manière interne par des phénomènes de phosphorylation, par des ligands endogènes ou par la composition lipidique. Elle peut également être dérégulée par des ligands exogènes ou par des mutations

ponctuelles conduisant à des maladies génétiques. Les principaux facteurs influençant la fonctionnalité de nAChRs sont énumérés ci-dessous.

- Nature des sous-unité

Du fait que les nAChRs $\alpha 7$ désensibilisent, la sous-unité α doit être suffisante pour conférer cette propriété au canal. Ces récepteurs montrent même la vitesse de désensibilisation la plus importante des nAChRs. Si par contre la sous-unité $\alpha 7$ est coexprimée avec $\beta 2$, la désensibilisation est diminuée d'un facteur 2, et les sous-unités β jouent donc aussi un rôle régulateur de désensibilisation (Khiroug et al., 2002).

Les nAChRs composés de sous-unités $\beta 4$ désensibilisent beaucoup plus lentement que leurs homologues contenant $\beta 2$, et ceci indépendamment de la nature de la sous-unité α . Des études menées sur des récepteurs formés d' $\alpha 3$ et de chimères $\beta 2$ - $\beta 4$ ont montré que le fragment N-terminal extracellulaire de $\beta 2$ lui confère ses propriétés de désensibilisation (Bohler et al., 2001). Les récepteurs contenant $\alpha 4$ désensibilisent aussi plus lentement que ceux contenant $\alpha 3$. La sous-unité $\alpha 5$ permettrait, en coexpression avec $\alpha 3\beta 4$ ou $\alpha 4\beta 2$, d'augmenter la vitesse de désensibilisation de ceux-ci (pour revue voir (Cordero-Erausquin et al., 2000)).

La diversité des nAChRs neuronaux rend leur analyse fonctionnelle difficile. Cependant, l'utilisation de souris knock-out et knock-in a grandement contribué à cette étude. On sait notamment que la perte d' $\alpha 3$ est létale, que la sous-unité $\beta 2$ est responsable de la dépendance à la nicotine et des facultés d'apprentissage, que la perte de $\beta 4$ est compensée par $\beta 2$ et que celle d' $\alpha 7$ ne produit que de très légers troubles (pour revue voir (Champtiaux & Changeux, 2002)).

Dans le nAChR musculaire adulte, la sous-unité δ est substituée par la sous-unité ϵ . La substitution γ - ϵ se traduit au niveau moléculaire par un temps moyen d'ouverture du canal réduit et une cinétique de désensibilisation accélérée (Naranjo & Brehm, 1993). Les déterminants moléculaires de ce phénotype ϵ (une région de 30 acides aminés dans la boucle intracellulaire ainsi qu'une contribution de 2 résidus de M4) ont été identifiés à l'aide de constructions chimères (Bouzat et al., 1994).

A

Maladie	Sous-unité	Localisation				Références
		Mutation	AChBP	Domaine	Fonction	
SCCMS	α	G153S	S147	L8	Boucle B du site ACh	Sine et al., 1995 Croxen et al., 1997
	α	V156M	I150	β 8	Boucle B du site ACh	Croxen et al., 1997
FCCMS	ϵ	P121L	S116	β 6	Interface des sous-unités	Ohno et al., 1996
	α	V132L	G127	L7	Boucle cystéine	Shen et al., 2003

B

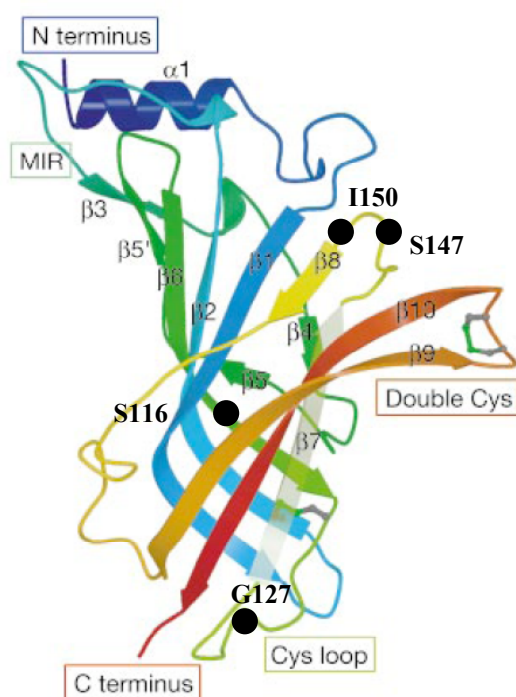


Figure 2-27 : Position des mutations de la partie extracellulaire du nAChR responsables de syndromes myasténiques congénitaux (CMS). (A) Tableau recensant les mutations du domaine extracellulaire conduisant au CMS. SCCMS = slow channel CMS, FCCMS = fast channel CMS. Le domaine structural (brin β ou boucle), la fonction de ce domaine et les positions équivalentes dans l'AChBP sont indiqués dans ce tableau et illustrés dans (B).

- Mutations ponctuelles naturelles

De nombreuses maladies motrices ou neurologiques sont associées à une dérégulation des nAChRs, dont certaines sont dues à une simple mutation ponctuelle. Ces dérèglements de la nature nous permettent de mieux comprendre le fonctionnement du nAChR et son impact sur l'organisme. On peut citer :

Les syndromes myasthéniques congénitaux (CMS) sont des maladies génétiques liées à des défauts synaptiques, dont certaines sont dues à une ou plusieurs mutations du nAChR musculaire. Ces mutations ont lieu principalement sur ϵ , mais aussi sur les trois autres sous-unités. On distingue les syndromes «canal lent» (SCCMS) dans lesquels le nAChR reste ouvert plus longtemps et l'affinité pour l'ACh est supérieure, et les syndromes «canal rapide» (FCCMS) dans lesquels les nAChRs s'ouvrent plus lentement, se referment plus rapidement et ont une affinité pour l'ACh réduite (pour revue voir (Engel et al., 2003)). On recense plus de 60 mutations, dont la majeure partie se trouve dans le domaine transmembranaire (principalement M2), bien qu'il existe aussi des mutations dans les domaines intra et extracellulaires. La **Figure 2-27** illustre les mutations extracellulaires responsables de CMS. Il est intéressant de noter que l'une de ces mutations se trouve dans la boucle cystéine (Shen et al., 2003).

L'épilepsie nocturne autosomale dominante de lobe frontal (ADNFLE) est une maladie très rare associée à des mutations sur $\alpha 4$ et $\beta 2$, au niveau des segments transmembranaires M2 (pour revue voir (Rozycka & Trzeciak, 2003)).

- Mutations ponctuelles expérimentales

De nombreuses mutations ponctuelles ont été générées afin d'étudier leur effet sur la désensibilisation le nAChR, mais on ne parlera ici que des plus marquantes. Certaines mutations sur M2 par exemple, au niveau des anneaux centraux 6', 9' et 13', conduisent à une augmentation de l'affinité pour l'ACh de 200 fois, ne désensibilisent plus, s'ouvrent spontanément, possèdent deux états conductants différents, et certains antagonistes deviennent agonistes (Revah et al., 1991; Devillers-Thiery et al., 1992). Ce phénotype atypique peut s'expliquer grâce au modèle MWC: la mutation déstabilise le canal fermé et

augmente sa probabilité d'ouverture, conduisant à l'apparition de courants spontanés. Par ailleurs, l'état désensibilisé est perméant aux ions, ce qui explique l'augmentation de l'affinité pour l'ACh, et les antagonistes stabilisant l'état D vont donc devenir des agonistes sur ces mutants. De manière opposée, des mutations dans le site ACh entraînent des changements dans la constante d'isomérisation entre l'état R et l'état A (Chen et al., 1995). La mutation $\alpha Y198F$ par exemple affecte l'ouverture du canal sans modification de l'affinité de l'ACh (Akk et al., 1999).

- Ligands endogènes

Comme on l'a déjà décrit dans la partie III-B de ce chapitre, de nombreux ligands endogènes autres que l'ACh peuvent moduler l'activité du nAChR, soit en se fixant dans le site orthostérique, soit en se fixant dans un site allostérique. Parmi les modulateurs allostériques endogènes du nAChR, on a déjà vu que des neurotransmetteurs (sérotonine), des hormones stéroïdiennes ou lipidiques, l'ATP ou des peptides (amyloïde β_{1-42} , neuropeptides) peuvent moduler les nAChRs par l'intermédiaires de sites allostériques distincts du site ACh.

Une toxine endogène (lynx1) homologue à l' α -BgTx a été découverte récemment dans le CNS des mammifères. Cette toxine est attachée à la membrane via une ancre GPI et module de manière endogène un large spectre de propriétés fonctionnelles d' $\alpha 4\beta 2$ (Ibanez-Tallon et al., 2002).

- Ligands exogènes

Nous avons déjà également cité dans la partie III-B de ce chapitre un bon nombre de drogues ou toxines qui ont pour cibles les nAChRs musculaires et neuronaux. D'une manière générale, les agonistes se lient au site ACh, activent le récepteur puis entraînent sa désensibilisation. La plupart des antagonistes, compétitifs ou non, stabilisent aussi cet état désensibilisé, mais sans passer par l'état actif (de la même manière que les agonistes présents à très faible concentration). Il existe cependant des antagonistes qui stabilisent l'état de repos du nAChR : les toxines de venin de serpent (Moore & McCarthy, 1995) et le BNC tétracaine (Boyd & Cohen, 1984) notamment.

- Phosphorylation

Les nAChRs musculaires et neuronaux possèdent plusieurs sites de phosphorylation situés sur la grande boucle intracellulaire entre M3 et M4. Les phosphorylations permettent de modifier les équilibres conformationnels du nAChR et joueraient donc un rôle dans la régulation à court et à long terme. La phosphorylation de ses sites sur γ et δ par la PKA permet d'augmenter la vitesse de désensibilisation des nAChRs musculaires par exemple. (pour revue voir (Swope et al., 1995)).

- Protéines

De plus en plus d'observations récentes font état d'interférences entre protéines membranaires de familles différentes. Certains récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G (RCPG) peuvent par exemple moduler l'activité de canaux : les récepteurs dopaminergiques D5 et D1 sont capables d'inhiber les récepteurs ionotropes GABA_A (Liu et al., 2000) et NMDA respectivement (Lee et al., 2002) ; les récepteurs adrénergiques β_2 stimulent les canaux calcium voltage dépendant Cav.1.2 (Davare et al., 2001). Les récepteurs ionotropes P₂X sont, quant à eux, capables d'interagir avec plusieurs récepteurs à boucle cystéine, dont le nAChR $\alpha_3\beta_4$ (Khakh et al., 2000), le récepteur GABA_A (Sokolova et al., 2001) et le récepteur 5HT₃ (Boue-Grabot et al., 2003). Les récepteurs P₂X₂ et nicotiniques $\alpha_3\beta_4$ co-activés génèrent notamment une inhibition mutuelle, probablement médiée par la boucle intracellulaire entre M3 et M4 du nAChR. Les changements de conformation d'un récepteur peuvent donc interférer avec celles du récepteur voisin (Khakh et al., 2000).

- Contraintes physico-chimiques

L'environnement lipidique du nAChR est capable de moduler grandement les cinétiques d'interconversion entre différents états du récepteur et peuvent même, dans certains cas, figer le nAChR dans un état. Les lipides anioniques et neutres, ainsi que le cholestérol, semblent notamment importants pour préserver la fonctionnalité du nAChR. Il semble que la fluidité lipidique de la membrane soit cruciale au bon fonctionnement du nAChR (Ryan et al., 1996; Baenziger et al., 2000).

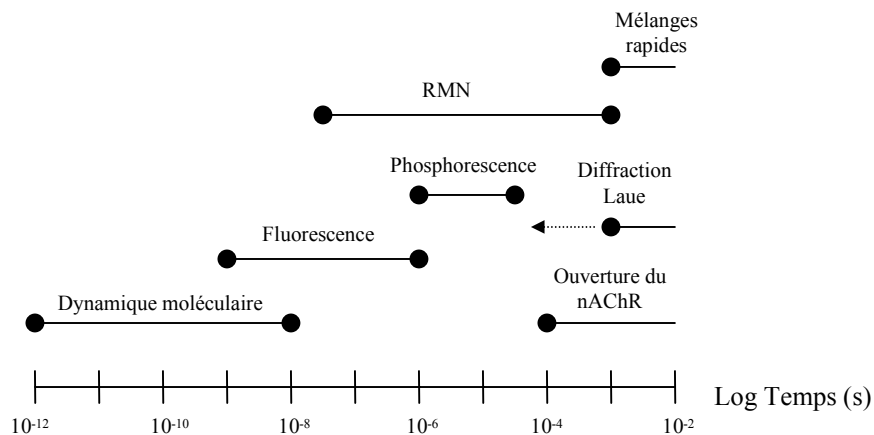


Figure 2-28: Echelle de temps des méthodes accessibles à l'étude de la dynamique structurale. D'après (Taylor, 2004).

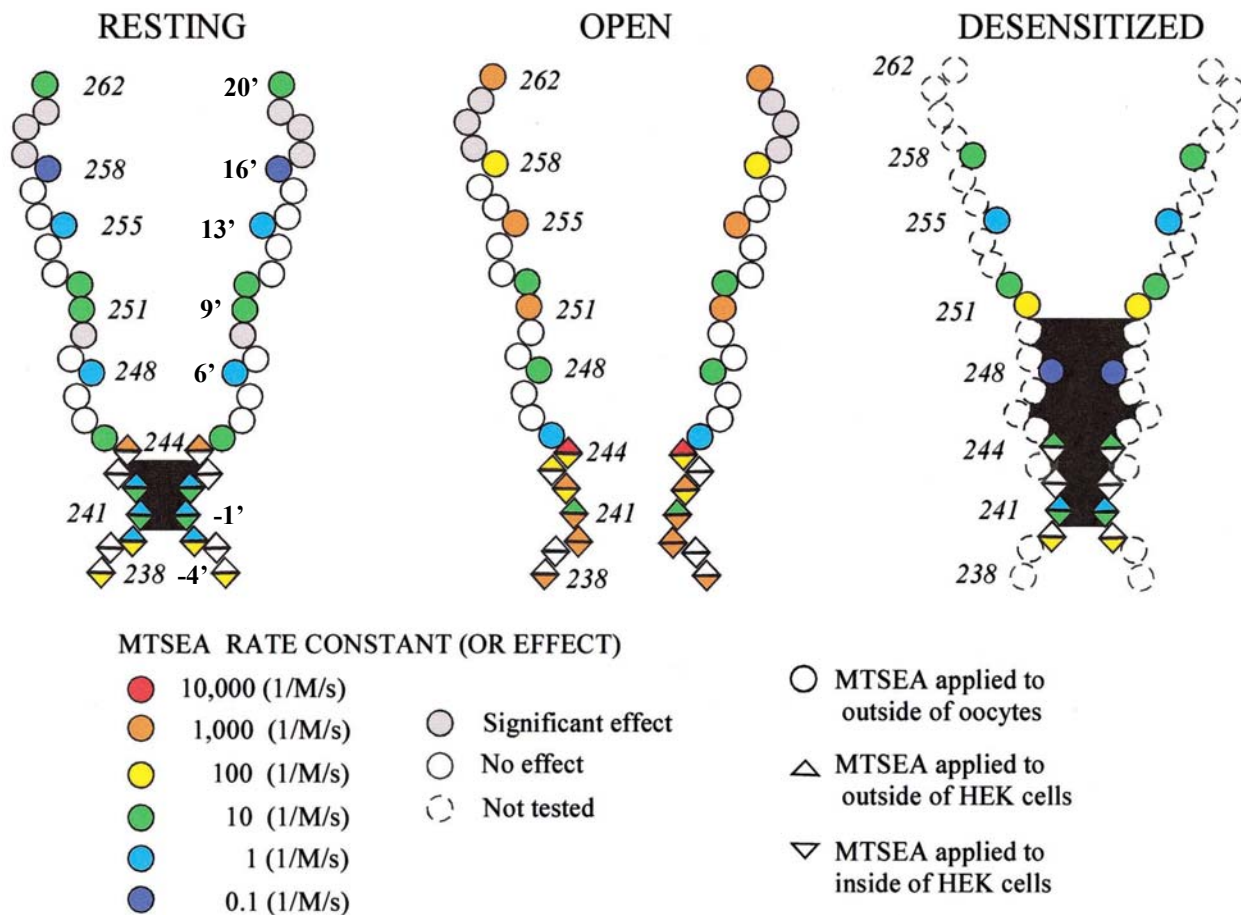


Figure 2-29: Réactivité des mutants cystéine de α M2 et α M1-M2 dans les états R, A et D. Deux segments α M2 sont représentés de manière schématique, délimitant le pore. Les portions du pore relativement imperméables au MTSEA, et de manière présumée aux cations inorganiques, sont peintes en noir. Les constantes de vitesse de couplage sont indiquées selon une échelle colorée, du rouge au bleu, de la plus grande à la plus petite. D'après (Wilson and Karlin, 2001).

Les ions présents dans le milieu peuvent aussi réguler le nAChR, comme on l'a déjà vu dans la partie III-B de ce chapitre avec les ions Ca^{2+} et Zn^{2+} pour lesquels des sites de liaison régulateurs sont supposés. Les protons seraient par ailleurs capables d'accroître les cinétiques d'ouverture du nAChR $\alpha 3\beta 4$ en augmentant l'affinité apparente des agonistes (Abdrakhmanova et al., 2002). De plus, le nAChR de torpille serait même figé dans un état désensibilisé à force ionique très faible, la force ionique semblant importante à la fois pour les transitions structurales du récepteur mais aussi pour la liaison des agonistes dans leurs sites (Song & Pedersen, 2000).

C) Dynamique structurale du nAChR

La liaison de deux agonistes sur le nAChR entraîne des réorganisations structurales majeures conduisant à l'ouverture du canal et à la désensibilisation du récepteur. De nombreuses études ont été entreprises afin de comprendre les mécanismes structuraux, soit au niveau du canal, soit au niveau du domaine transmembranaire, de ce bouleversement moléculaire. La **Figure 2-28** présente les principales techniques d'étude de dynamique protéique ainsi que leur résolution temporelle.

- Dynamique du domaine transmembranaire

Le marquage de photoaffinité a été un des premiers outils permettant de montrer les réorganisations structurales du site canal. Les incorporations de [^{125}I]TID, [^3H]DAF et [^3H]tetracaine sont notamment réduite de 70 à 90 % en présence d'agoniste, et montrent un profil d'incorporation plus étendu, notamment vers des anneaux plus proches du cytoplasme (White & Cohen, 1992; Blanton et al., 1998; Middleton et al., 1999). Ces marquages sont en accord avec une expansion du site BNC et une entrée de molécules d'eau dans ce site sous l'état D par rapport à l'état R.

Le SCAM a aussi permis d'étudier l'accessibilité des résidus de M2 et de la boucle M1-M2 de l'intérieur ou de l'extérieur de la cellule sous les états R, A et D du nAChR. La **Figure 2-29** montre que les mêmes résidus sont marqués dans les trois états du récepteur, mais pas avec les mêmes cinétiques. Par ailleurs, la constriction minimale du canal est différente entre l'état D et l'état R : sous l'état R, la constriction est réduite et située à l'extrémité cytoplasmique de M2 et dans la boucle M1-M2 ; sous l'état D, cette constriction

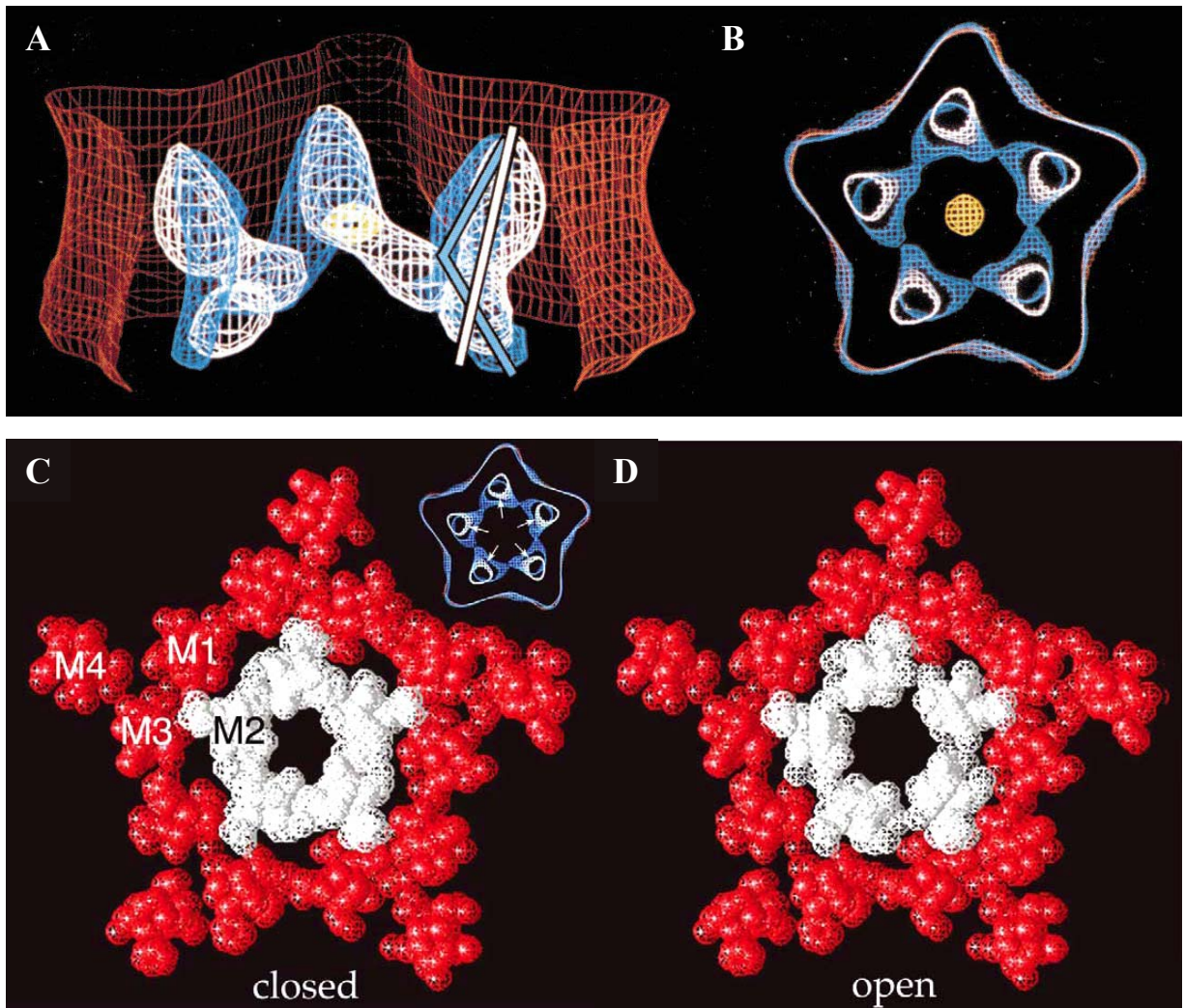


Figure 2-30: Réorganisations structurales de la région transmembranaire du nAChR de torpille par M.E. Coupe longitudinale (A) et transversale (B) à 9 Å de résolution dans lesquelles on voit l'interface lipides-protéine en rouge. Les hélices courbes α M2 sont en bleu sous l'état de repos et en blanc sous l'état ouvert. D'après (Unwin, 1995). Coupes transversales à 4 Å de résolution sous l'état R (C) et A (D) dans lesquelles on voit les segments M2 en blanc et les segments M1, M3 et M4 en rouge. Le pore présente une augmentation d'ouverture d'environ 3 Å. D'après (Unwin, 2003).

s'étend jusqu'à l'anneau 9', au milieu de M2 (Wilson & Karlin, 2001). Différentes positions pour cette constriction selon l'état du nAChR avaient déjà été proposées par mesure de courant sur canaux uniques (Auerbach & Akk, 1998). La position de la constriction du canal sous l'état R est en désaccord avec les interprétations d'Unwin concernant la structure du canal à 4 Å, où cette constriction sous l'état R serait au milieu de M2 (Miyazawa et al., 2003).

La microscopie électronique a permis de «photographier» le nAChR de torpille dans son état ouvert, grâce à un système qui permet d'activer le récepteur par une impulsion brève d'ACh (< 5 ms) et de figer ensuite cet état ouvert par congélation rapide. Les cartes de différences de densité électroniques à 9 Å et à 4 Å de résolution montrent, pour la partie membranaire, une rotation droite de 15° des cinq M2, ainsi qu'un espace plus large de plusieurs Å au centre du canal (voir **Figure 2-30**). Ce mouvement des M2 ne s'accompagne par contre pas de modifications structurales visibles des 3 autres segments transmembranaires. La rotation de M2 est en fait rendue possible par la présence de deux résidus glycine localisés aux deux extrémités de M2 et par l'espace rempli d'eau situé entre M2 et les autres segments (Unwin, 1995; Miyazawa et al., 2003). La symétrie du nAChR est donc préservée au niveau du domaine transmembranaire entre l'état R et l'état A, en accord avec le modèle MWC. Une rotation des M2 (asymétrique cependant) a aussi été suggérée récemment pour le récepteur GABA (Horenstein et al., 2001). Par contre, ces rotations ne semblent pas en accord avec les marquages de photoaffinité et le SCAM pour lesquels les mêmes résidus ont été marqués quels que soient les états conformationnels du nAChR.

- Dynamique du domaine extracellulaire

Le marquage de photoaffinité a été une fois de plus l'une des première technique permettant de visualiser au niveau moléculaire les réorganisations du domaine extracellulaire, et tout particulièrement du site ACh. Le marquage de photoaffinité avec l'antagoniste [³H]DDF a montré que, pendant la transition de l'état R à l'état D, le marquage des boucles A et B sur α augmente de 6 fois, tandis que celui sur δ augmente un peu et celui sur γ diminue. Ce résultat a permis de montrer que les transitions allostériques observées par électrophysiologie sont bien associées à des modifications structurales du nAChR. Il est également en accord avec le fait que l'affinité des antagonistes compétitifs est plus importante sous l'état D (Galzi et al., 1991). Le caractère antagoniste du DDF ne permet cependant pas d'étudier les transitions du récepteur nicotinique via l'état actif, aussi notre équipe a décidé de

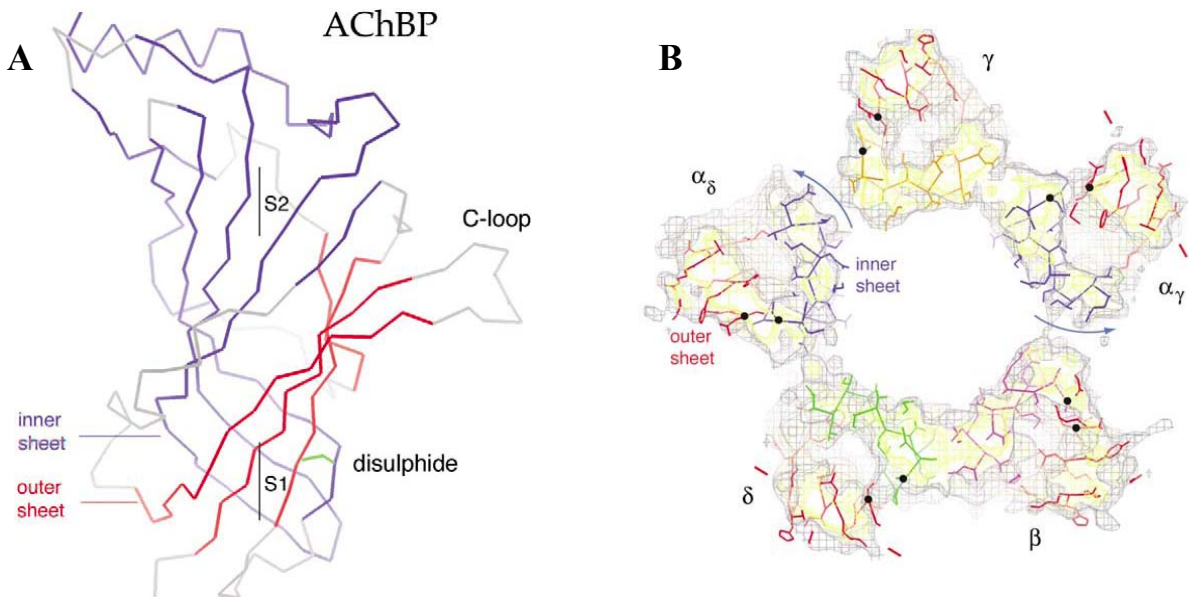


Figure 2-31: Représentation des réarrangements structuraux du domaine extracellulaire du nAChR de torpille après activation par l'ACh. (A) structure du protomère d'AChBP dans lequel la partie intérieure (en bleu) et la partie extérieure (en rouge) du sandwich β sont représentées. Ces deux parties sont reliées entre elles par le pont disulfure conservé (en vert). La structure de ce sandwich β a été superposée à la structure obtenue par M.E. à 4,6 Å de résolution. **(B)** Section transversale au niveau de S1 dans laquelle les parties extérieures des sandwich β sont représentées en rouge et les parties inférieures de différentes couleurs suivant la sous-unité. Les flèches indiquent les rotations de 15° subies par les parties intérieures des sandwichs des sous-unités α lors de l'activation par l'ACh. D'après (Unwin et al., 2002).

synthétiser des agonistes photosensibles (Kotzyba-Hibert et al., 1997). La sonde [³H]DCTA a ainsi permis d'étudier pour la première fois par marquage de photoaffinité la transition de l'état I vers l'état D, l'état actif étant trop fugace. Bien que les mêmes résidus aient été marqués sur la sous-unité α sous les deux états, cette sonde a permis de montrer un rapprochement de la sous-unité γ au cours de la désensibilisation, en accord avec un site plus fermé (Grutter et al., 2002).

La microscopie électronique a elle aussi apporté des informations conséquentes sur la dynamique structurale du domaine extracellulaire. Les images du récepteur actif obtenues à 9 Å de résolution montrent que l'ACh provoque une petite rotation tangentielle à l'axe de pseudo-symétrie des sous-unités α seulement (Unwin, 1995). En superposant les cartes de densité électroniques obtenues par M.E. à la structure de l'AChBP, Unwin et collaborateurs ont montré qu'il existait deux types de conformations pour les sous-unités : une correspond aux sous-unités α avant activation (état R) et l'autre correspond à la fois aux sous-unités α après activation, aux trois autres sous-unités quel que soit l'état du nAChR et aux sous-unités de l'AChBP. Par soucis de simplicité, les auteurs parlent de conformation α et non- α respectivement. Ainsi, la liaison de molécules d'ACh permettrait aux sous-unités α de passer d'une conformation tendue α à une conformation relâchée non- α , rendant l'architecture globale du récepteur plus symétrique. Le changement tertiaire de structure des sous-unité α est défini par un mouvement relatif des parties inférieures et supérieures du sandwich β autour du pont disulfure (voir **Figure 2-31**). Plus précisément, la partie inférieure (côté lumen) subit une rotation d'environ 15° par rapport à un axe perpendiculaire à la membrane (Unwin et al., 2002).

La structure de l'AChBP a indiscutablement apporté une lumière sur la structure du nAChR, mais a aussi permis d'émettre des hypothèses sur les réorganisations structurales du récepteur nicotinique (Dougherty & Lester, 2001; Grutter & Changeux, 2001). Cette structure présente une conformation compacte qui pourrait correspondre soit au récepteur sous l'état D d'après les affinités mesurées sur l'AChBP (Grutter & Changeux, 2001), soit plus vraisemblablement au récepteur sous l'état actif d'après la microscopie électronique (Unwin et al., 2002) ou d'après les vitesses de dissociation d'agonistes et antagonistes (Hansen et al., 2002), mais certainement pas au nAChR sous l'état R pour lequel un site agoniste plus ouvert est prédit (Le Novère et al., 2002). Par ailleurs, aucune évidence

de coopérativité de liaison n'a été mise en évidence pour l'AChBP mais l' α -BgTx semble stabiliser un autre état de l'AChBP. Il se pourrait donc que l'AChBP possède les propriétés allostériques du nAChR (Hansen et al., 2002). Très récemment, plusieurs chimères AChBP - 5-HT₃R ont été construites, dont certaines donnent un récepteur fonctionnel. L'AChBP semble donc posséder les déterminants moléculaires nécessaires et suffisants à l'établissement de transitions structurales (Bouzat et al., 2004). La structure de l'AChBP complexée avec la nicotine ou la CCh ne montre pas de réorganisation quaternaire du pentamère. Seules des modifications mineures de la structure de la boucle C sont observées, relatant plus d'une adaptation du site autour du ligand que de réels changements conformationnels. Ces nouvelles structures n'ont donc pas permis de comprendre la dynamique du nAChR (Celie et al., 2004). Elles apportent cependant un début d'explication au fait que les agonistes, mais pas les antagonistes, protègent le pont disulfure vicinal contre la réduction par le DTT (Damle & Karlin, 1980): quand un agoniste est dans le site, le pont disulfure est inaccessible. Cette structure de l'AChBP pourrait donc être équivalente à la structure du nAChR sous l'état actif ouvert, et il est possible que lorsqu'un antagoniste occupe le site, le site soit moins refermé et donc le pont disulfure plus accessible (Karlin, 2002).

La mutagenèse dirigée appliquée au nAChR entre dans une nouvelle ère grâce à la structure de l'AChBP : il est possible d'étudier le rôle fonctionnel de nouveaux résidus susceptibles d'intervenir dans les mécanismes allostériques. La structure de l'AChBP a révélé notamment la présence d'une liaison hydrogène entre deux boucles (B et C) du site agoniste. Des études sur des chimères $\alpha 7$ - $\alpha 4$ ont montré que cette liaison hydrogène existe uniquement chez $\alpha 4$ et lui confère ses propriétés de désensibilisation beaucoup plus lente (Grutter et al., 2003). Ce lien non covalent se mettrait en place dans l'état ouvert, voir désensibilisé, du nAChR et permettrait ainsi une ouverture plus longue du nAChR contenant $\alpha 4$ par rapport à $\alpha 7$. L'activation du nAChR passerait donc par un mouvement concerté des boucles B et C du site ACh. De manière notable, une mutation du résidu de la boucle B homologue sur $\alpha 1$ (G153S, voir **Figure 2-27**) est responsable d'une SCCMS ; la mise en place d'une liaison hydrogène dans ce mutant permet d'expliquer ce gain de fonction (Grutter et al., 2003).

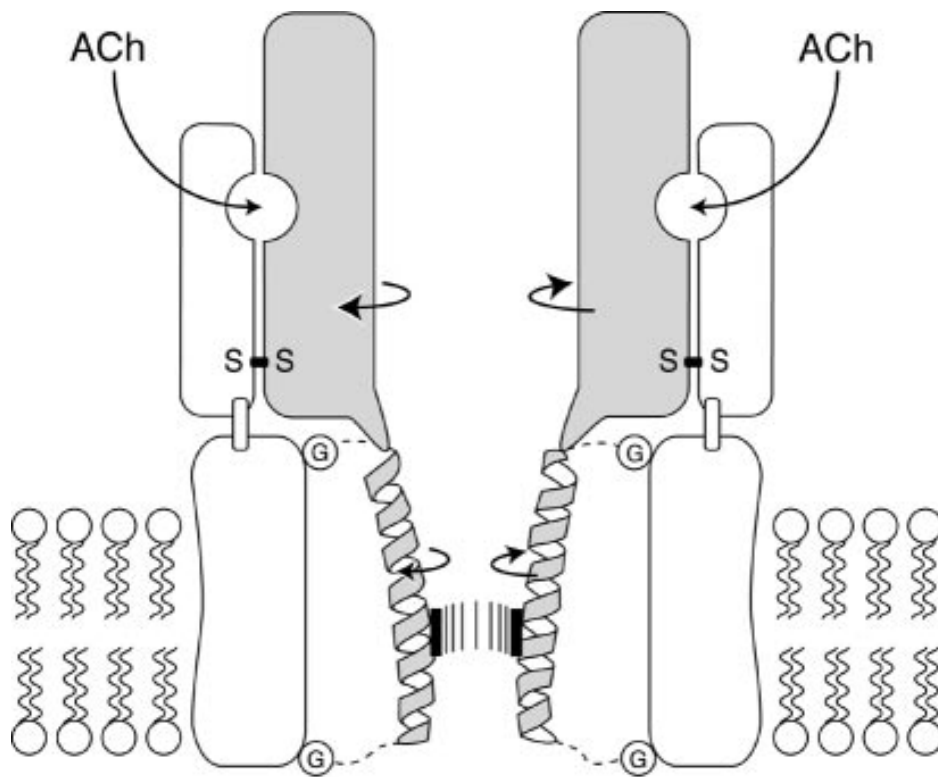


Figure 2-32: Modèle proposé pour le mécanisme d'ouverture du nAChR. La liaison de deux molécule d'ACh entraîne une rotation des parties internes (en gris) du sandwich β . La partie externe du sandwich (en blanc) ne bouge pas. Le pont disulfure très conservé sert de charnière à cet édifice extracellulaire. Cette rotation extracellulaire est ensuite transmise aux segments M2 (en gris) grâce à l'interaction « pin-into-socket » entre L2 et l'extrémité de M2. La rotation des M2 est rendue possible grâce à la présence de deux glycines aux extrémités de M2 et à l'espace rempli d'eau entre M2 et les trois autres segments transmembranaires. Seules les parties grisées du nAChR subiraient donc des mouvements durant l'ouverture du canal. D'après (Miyazawa et al., 2003).

- **Connection entre les deux domaines et mécanisme général**

Alors que seules les sous-unités α semblent bouger dans la partie extracellulaire lors de l'activation du récepteur, tous les segments M2 s'écartent pour laisser passer les ions. Comment se transmet l'information entre ces deux domaines ?

La structure de l'AChBP révèle que deux boucles, la boucle cystéine L7 et la boucle L2, sont à proximité du domaine membranaire et pourraient interagir avec le domaine transmembranaire du nAChR (Brejc et al., 2001).

La microscopie électronique à 4 Å de la région membranaire du nAChR de torpille confirme la proximité de ces deux boucles de la membrane, mais surtout montre que la boucle L2 (α V44) pénètre dans l'extrémité de M2 (α S269- α P272) selon une interaction « pin-into-socket ». Les changements allostériques qui affectent d'abord les sous-unités α se traduisent par une rotation de la partie interne du sandwich β (**Figure 2-31**). Cette rotation serait ensuite transmise aux M2 des sous-unités α par la boucle L2. Cette rotation des α M2 déstabiliserait l'ensemble des M2 qui subiraient à leur tour une rotation de manière coopérative. L'ouverture du canal symétrique par mouvement des cinq M2 peut donc être accomplie par la liaison de seulement deux agonistes (Miyazawa et al., 2003). La **Figure 2-32** schématise un mécanisme hypothétique d'ouverture du nAChR.

Des mutations naturelles sur la boucle M2-M3 de la sous-unité α perturbent l'ouverture du canal sans changer l'affinité de l'ACh pour son site (Campos-Caro et al., 1996; Grosman et al., 2000). Le fait que des mutations identiques sur les sous-unités non- α ne conduisent pas au même phénotype est en accord avec le modèle d'Unwin où seuls les domaines extracellulaires α bougent (Miyazawa et al., 2003). De la même manière, la mutation α V132L sur la boucle cystéine L7 conduit à un dysfonctionnement de l'ouverture du nAChR musculaire (voir **Figure 2-27** et (Shen et al., 2003)) alors que la mutation homologue sur les autres sous-unités est quasiment sans effet, montrant à la fois l'implication de la boucle cystéine dans l'ouverture du canal et le rôle particulier d' α dans la dynamique d'ouverture du canal.

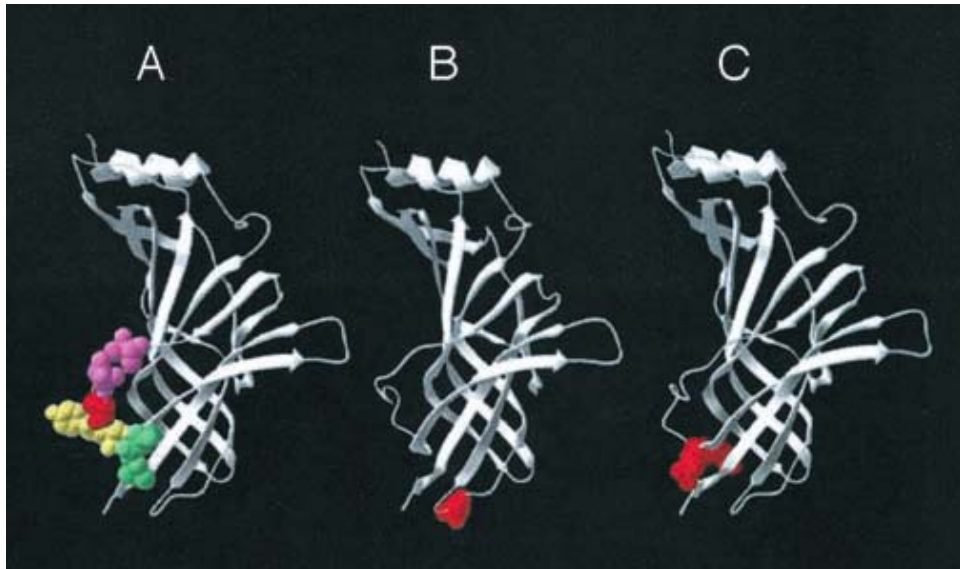


Figure 2-33: Résidus de l'AChBP homologues aux résidus de la sous-unité $\alpha 1$ du nAChR photomarqués par des sondes hydrophobes. (A) résidus de la boucle L9 marqués sous l'état actif : $\alpha 1$ S162 et D163 violet), L167 (rouge), S173 et G174 (jaune) et K179 et E180 (vert). (B) Résidu $\alpha 1$ H134 de la boucle cystéine L7 marqué sous l'état R. (C) Résidus $\alpha 1$ W176 et V177 de la boucle L9 marqués sous l'état D. D'après (Leite et al., 2003).

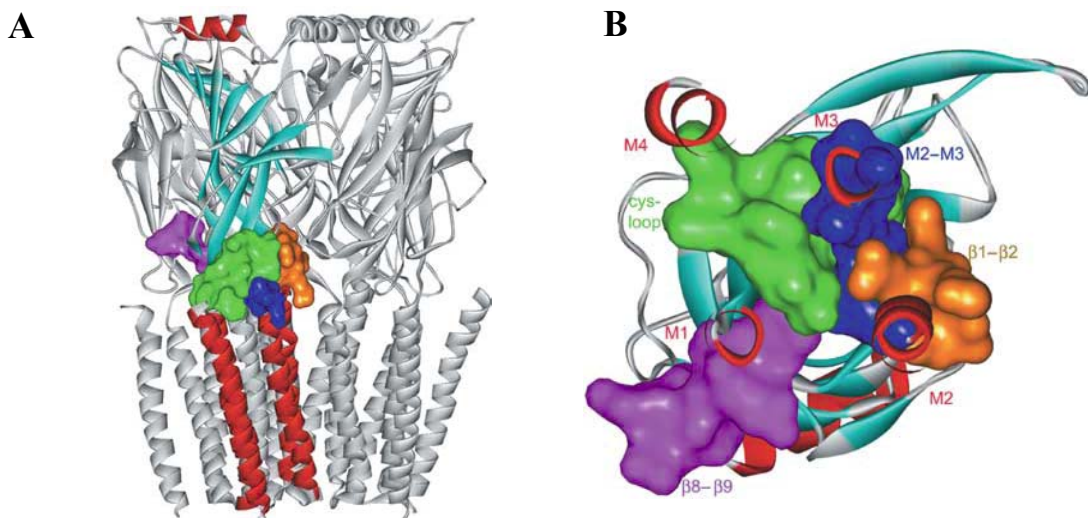


Figure 2-34: Chimères 5-HT₃R - AChBP. (A) Modèle du récepteur chimérique. Les hélices α sont en rouge et les feuillets β en cyan. Les régions d'intérêt sont colorées: boucles L2 (orange), L7 ou boucle cystéine (vert), L9 (magenta) et M2-M3 (bleu). (B) Vue rapprochée de la zone de couplage entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire. D'après (Bouzat et al., 2004).

Les analyses de relations linéaires entre énergie libre et taux d'équilibre de différents mutants (LFERs) ont montré de manière élégante que la boucle M2-M3 est un intermédiaire dans la « vague conformationnelle » initiée dans le domaine extracellulaire et finissant dans les segments M2, toujours en accord avec le modèle d'Unwin (Grosman et al., 2000). Ces études ont mis en évidence aussi les mouvements de la boucle L5, située entre le site ACh et les boucles L2 et L7 (voir **Figure 2-35**) (Chakrapani et al., 2003). La boucle L5 du domaine extracellulaire bouge en premier, suivie des boucles L2 et L7, puis de la boucle M2-M3 transmet le mouvement à M2 (Chakrapani et al., 2004).

Un pontage chimique entre des mutants cystéines de la boucle L2 et de la boucle M2-M3 du récepteur GABA_A a pu être réalisé, prouvant que ces deux régions sont à proximité pour ce récepteur. Par ailleurs, un autre pontage chimique entre un mutant de la boucle cystéine L7 et le même résidu sur M2-M3 a lieu uniquement en présence de GABA, ce qui prouve d'une part que la boucle cystéine peut intervenir aussi dans le phénomène d'ouverture (en accord avec le mutant générant un FCCMS, voir **Figure 2-27** et (Shen et al., 2003)) et d'autre part que ces deux boucles (voir **Figure 2-35**) se rapprochent l'une de l'autre lors de l'activation (Kash et al., 2003). Cette étude est en accord avec l'accessibilité réduite de M2-M3 lors de l'activation du GABA_AR (Bera et al., 2002) et avec le modèle d'Unwin. Cette interaction L2-L7 avec la boucle M2-M3 est cependant de type électrostatique pour le récepteur GABA_A (Kash et al., 2003) alors qu'elle serait plutôt soit de type hydrogène, soit hydrophobe (Miyazawa et al., 2003) chez le nAChR. Bien que le type d'interactions semble différer entre récepteurs GABA et nicotiques, le fait que la chimère $\alpha 7$ -5HT₃ soit fonctionnelle (Eisele et al., 1993) montre que le mécanisme général doit être identique chez tous les membres des récepteurs canaux à boucle cystéine.

L'ECP-MS (Electrophysiology-Coordinated Photolabelling with subsequent Mass Spectrometry analyses) a permis récemment d'utiliser le marquage de photoaffinité pour étudier l'accessibilité de certaines régions sur le nAChR natif. De manière remarquable, des sondes hydrophobes s'incorporent dans la partie extracellulaire du récepteur, notamment dans la boucle cystéine L7 sous l'état R. Les sondes s'incorporent également dans la boucle L9 mais uniquement dans les états ouverts et désensibilisés du nAChR (**Figure 2-33**), suggérant un mouvement de cette boucle lors de l'activation d'un environnement hydrophile vers un environnement hydrophobe (Leite et al., 2003).

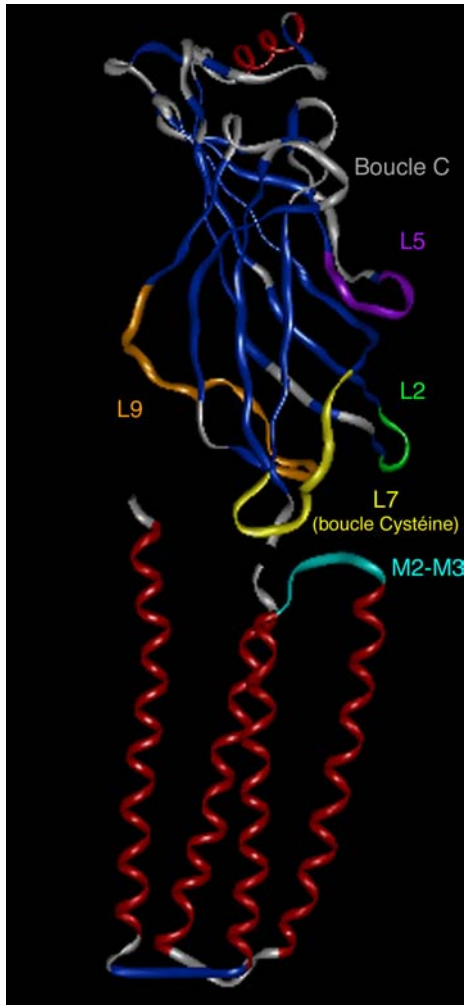


Figure 2-35: Superposition des structures de l'AChBP (119B) et du domaine transmembranaire du nAChR de torpille (1OED). Les feuillet β sont colorés en bleu, les hélices α en rouge et les boucles en blanc. Les boucles impliquées dans les phénomènes d'ouverture du canal sont indiquées en vert (L2), en violet (L5), en jaune (boucle cystéine L7), en orange (L9) et en cyan (M2-M3). La boucle C du site agoniste est indiquée. La boucle M2-M3 pointe entre les deux boucles extracellulaires L7 et L2. Image réalisée avec iMol 0.3.

Constructions de chimères : très récemment, des chimères composées de l'AChBP et de la partie transmembranaire du récepteur 5-HT₃ ont été construites. La chimère où toute la partie extracellulaire est composée d'AChBP s'exprime, lie l'ACh mais n'est pas active. Il faut substituer l'ensemble de trois boucles (L2, L7 et L9) de l'AChBP par leurs homologues 5-HT₃ pour obtenir un récepteur fonctionnel (**Figure 2-34**). Ces résultats suggèrent donc une interaction spécifique de ces trois boucles avec le domaine transmembranaire (Bouzat et al., 2004).

En conclusion, pendant l'ouverture du canal, le nAChR subit une série de transitions qui se propagent du site agoniste au site canal. La transmission de l'information entre le domaine extracellulaire et le domaine transmembranaire fait intervenir les boucles L2, L7, L9 et M2-M3 (**Figure 2-35**). Il existe effectivement des interactions spécifiques entre ces différentes boucles, intra ou inter-sous-unités : les boucles L2 et L7 sont en contact direct, alors que les boucles L9 et L7 sont indirectement en contact par le biais du brin β 10. Par ailleurs, la boucle L2 d'une sous-unité est en contact avec la boucle L9 de la sous-unité voisine. Le contact entre les domaines membranaires et extracellulaires s'établit entre la boucle M2-M3 d'une part et les boucles L7 et L2 d'autre part. De nombreuses revues récentes font l'état de l'art concernant les nouvelles hypothèses et prédictions de dynamique structurale des canaux membres de la famille à boucle cystéine (Absalom et al., 2004; Colquhoun & Sivilotti, 2004; Connolly & Wafford, 2004; Doyle, 2004; Lester et al., 2004).

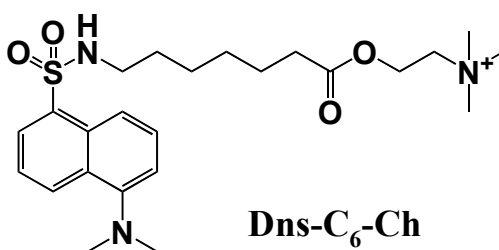
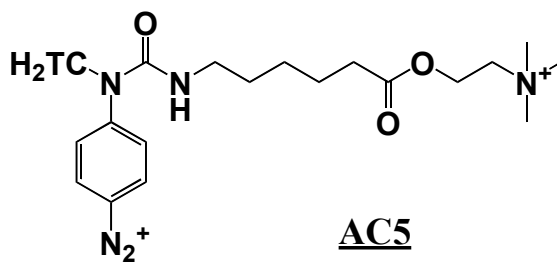


Figure 2-36: Structures chimiques d'AC5 et de la Dansyl-C₆-choline

V) But de la présente étude

En absence de structure à haute résolution du nAChR dans chacun de ses états, et étant donné la probable complexité structurale des transitions allostériques, il paraît crucial de développer plusieurs méthodologies permettant de décrire ce phénomène avec précision. Nous nous proposons d'étudier ces réorganisations structurales à l'aide d'une technique développée dans notre laboratoire : le marquage de photoaffinité dynamique.

Cette technique a été utilisée avec succès pour étudier les transitions allostériques du site agoniste lors du passage de l'état R à l'état D grâce à l'antagoniste DDF (Galzi et al., 1991) et pour étudier les transitions allostériques de l'état I à l'état D grâce à l'agoniste partiel DCTA (Grutter et al., 2002).

Au vu de la structure de l'AChBP, il nous a paru alléchant de réutiliser un agoniste décrit précédemment au laboratoire : AC5 (Chatrenet et al., 1992). Cet agoniste photosensible est un homologue structural de l'agoniste fluorescent Dansyl-C₆-Choline qui a largement contribué à l'étude dynamique et structurale du nAChR depuis presque 30 ans (structures **Figure 2-36**). La sonde AC5, d'après sa structure chimique flexible, doit nous permettre d'étudier l'environnement du site ACh au cours de la désensibilisation.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes fixé plusieurs objectifs : (1) optimiser la synthèse du [³H]AC5 afin de pouvoir travailler avec des quantités importantes de ligand radioactif (Chapitre 3); (2) réanalyser et réinterpréter les résultats de photomarquage sous l'état D de Benoit Chatrenet et collaborateurs, qui paraissent en désaccord avec la structure de l'AChBP (notamment le marquage de la sous-unité β) (Chapitre 4); (3) analyser les profils d'incorporation de cette sonde au cours du temps à l'aide d'un appareil de mélange rapide (chapitre 5); et (4) identifier les peptides et résidus alkylés sous l'état D thermodynamiquement stable (chapitre 6).

Il serait notamment très remarquable de pouvoir répondre à de nombreuses questions grâce à cette technique, et notamment savoir si seules les sous-unités α bougent, ou si le mouvement des sous-unités est plutôt séquentiel ou concerté.

- Abdrakhmanova G, Dorfman J, Xiao Y, Morad M. **2002.** *Protons enhance the gating kinetics of the $\alpha 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by increasing its apparent affinity to agonists.* Mol Pharmacol 61:369-378.
- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. **2003.** *Structure and mechanism of the lactose permease of Escherichia coli.* Science 301:610-615.
- Abramson SN, Li Y, Culver P, Taylor P. **1989.** *An analog of lophotoxin reacts covalently with Tyr190 in the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor.* J Biol Chem 264:12666-12672.
- Absalom NL, Lewis TM, Kaplan W, Pierce KD, Schofield PR. **2003.** *Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor.* J Biol Chem 278:50151-50157.
- Absalom NL, Lewis TM, Schofield PR. **2004.** *Mechanisms of channel gating of the ligand-gated ion channel superfamily inferred from protein structure.* Exp Physiol 89:145-153.
- Ahern CA, Horn R. **2004.** *Stirring up controversy with a voltage sensor paddle.* Trends Neurosci 27:303-307.
- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A. **1994.** *Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit.* Neuron 13:919-927.
- Akk G, Zhou M, Auerbach A. **1999.** *A mutational analysis of the acetylcholine receptor channel transmitter binding site.* Biophys J 76:207-218.
- Albuquerque EX, Costa AC, Alkondon M, Shaw KP, Ramoa AS, Aracava Y. **1991.** *Functional properties of the nicotinic and glutamatergic receptors.* J Recept Res 11:603-625.
- Alexeev T, Krivoshein A, Shevalier A, Kudelina I, Telyakova O, Vincent A, Utkin Y, Hucho F, Tsetlin V. **1999.** *Physicochemical and immunological studies of the N-terminal domain of the Torpedo acetylcholine receptor α -subunit expressed in Escherichia coli.* Eur J Biochem 259:310-319.
- Arias HR. **1998.** *Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor.* Biochim Biophys Acta 1376:173-220.
- Arias HR. **2000.** *Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors.* Neurochem Int 36:595-645.
- Arias HR, McCardy EA, Gallagher MJ, Blanton MP. **2001.** *Interaction of barbiturate analogs with the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor ion channel.* Mol Pharmacol 60:497-506.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E. **1998.** *Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate.* Nature 395:913-917.
- 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.
- Auerbach A, Akk G. **1998.** *Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism.* J Gen Physiol 112:181-197.
- Autelitano F, Weill C, Goeldner M, Ilien B. **1997.** *Covalent labeling of muscarinic acetylcholine receptors by tritiated aryldiazonium photoprobes.* Biochem Pharmacol 53:501-510.
- Avramopoulou V, Mamalaki A, Tzartos SJ. **2004.** *Soluble, oligomeric and ligand-binding extracellular domain of human $\alpha 7$ acetylcholine receptor expressed in yeast. Replacement of the hydrophobic Cys-loop by the hydrophilic loop of ACh-binding protein enhances protein solubility.* J Biol Chem.

- Baenziger JE, Morris ML, Darsaut TE, Ryan SE. **2000.** *Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor.* J Biol Chem 275:777-784.
- Barrantes FJ, Antollini SS, Blanton MP, Prieto M. **2000.** *Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains.* J Biol Chem 275:37333-37339.
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. **2002.** *Crystal structure of Escherichia coli MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel.* Science 298:1582-1587.
- Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, Dougherty DA. **2002.** *Cation- π interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT_{3A}) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine.* Biochemistry 41:10262-10269.
- Beg AA, Jorgensen EM. **2003.** *EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel.* Nat Neurosci 6:1145-1152.
- Bera AK, Chatav M, Akabas MH. **2002.** *GABA(A) receptor M2-M3 loop secondary structure and changes in accessibility during channel gating.* J Biol Chem 277:43002-43010.
- Bertrand D, Devillers-Thierry A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. **1992.** *Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain.* Proc Natl Acad Sci U S A 89:1261-1265.
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thierry A, Bertrand S, Changeux JP. **1993.** *Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal alpha 7 nicotinic receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 90:6971-6975.
- Bertrand S, Devillers-Thierry A, Palma E, Buisson B, Edelstein SJ, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D. **1997.** *Paradoxical allosteric effects of competitive inhibitors on neuronal alpha7 nicotinic receptor mutants.* Neuroreport 8:3591-3596.
- Bixel MG, Weise C, Bolognesi ML, Rosini M, Brierly MJ, Mellor IR, Usherwood PN, Melchiorre C, Hucho F. **2001.** *Location of the polyamine binding site in the vestibule of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel.* J Biol Chem 276:6151-6160.
- Blanton MP, Cohen JB. **1992.** *Mapping the lipid-exposed regions in the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor.* Biochemistry 31:3738-3750.
- Blanton MP, Cohen JB. **1994.** *Identifying the lipid-protein interface of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications.* Biochemistry 33:2859-2872.
- Blanton MP, Li YM, Stimson ER, Maggio JE, Cohen JB. **1994.** *Agonist-induced photoincorporation of a p-benzoylphenylalanine derivative of substance P into membrane-spanning region 2 of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor delta subunit.* Mol Pharmacol 46:1048-1055.
- Blanton MP, Dangott LJ, Raja SK, Lala AK, Cohen JB. **1998.** *Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel with the uncharged photoactivable compound -3H-diazofluorene.* J Biol Chem 273:8659-8668.
- Blanton MP, McCardy EA, Huggins A, Parikh D. **1998.** *Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with the hydrophobic photoreactive probes [125I]TID-BE and [125I]TIDPC/16.* Biochemistry 37:14545-14555.
- Blanton MP, Xie Y, Dangott LJ, Cohen JB. **1999.** *The steroid promegestone is a noncompetitive antagonist of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor that interacts with the lipid-protein interface.* Mol Pharmacol 55:269-278.
- Blount P, Merlie JP. **1989.** *Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor.* Neuron 3:349-357.
- Bohler S, Gay S, Bertrand S, Corringer PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. **2001.** *Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the beta 2 subunit.* Biochemistry 40:2066-2074.

- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, Seguela P. **2003.** *Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels.* J Neurosci 23:1246-1253.
- Bouzat C, Bren N, Sine SM. **1994.** *Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors.* Neuron 13:1395-1402.
- Bouzat C, Barrantes FJ. **1996.** *Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade.* J Biol Chem 271:25835-25841.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, Sine SM. **2004.** *Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel.* Nature 430:896-900.
- Boyd ND, Cohen JB. **1980.** *Kinetics of binding of [3H]acetylcholine and [3H]carbamoylcholine to Torpedo postsynaptic membranes: slow conformational transitions of the cholinergic receptor.* Biochemistry 19:5344-5353.
- Boyd ND, Cohen JB. **1984.** *Desensitization of membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: studies of [3H]acetylcholine binding and $^{22}\text{Na}^+$ ion fluxes.* Biochemistry 23:4023-4033.
- Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. **2001.** *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.* Nature 411:269-276.
- Brown DA, Kwiatkowski D. **1976.** *A note on the effect of dithiothreitol (DTT) on the depolarization of isolated sympathetic ganglia by carbachol and bromo-acetylcholine.* Br J Pharmacol 56:128-130.
- Buisson B, Bertrand D. **2002.** *Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation.* Trends Pharmacol Sci 23:130-136.
- Butt CM, Hutton SR, Marks MJ, Collins AC. **2002.** *Bovine serum albumin enhances nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes.* J Neurochem 83:48-56.
- Caffrey M. **2003.** *Membrane protein crystallization.* J Struct Biol 142:108-132.
- Campos-Caro A, Sala S, Ballesta JJ, Vicente-Agullo F, Criado M, Sala F. **1996.** *A single residue in the M2-M3 loop is a major determinant of coupling between binding and gating in neuronal nicotinic receptors.* Proc Natl Acad Sci U S A 93:6118-6123.
- Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. **2004.** *Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures.* Neuron 41:907-914.
- Chakrapani S, Bailey TD, Auerbach A. **2003.** *The role of loop 5 in acetylcholine receptor channel gating.* J Gen Physiol 122:521-539.
- Chakrapani S, Bailey TD, Auerbach A. **2004.** *Gating dynamics of the acetylcholine receptor extracellular domain.* J Gen Physiol 123:341-356.
- Champtiaux N, Changeux JP. **2002.** *Knock-out and knock-in mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system.* Curr Drug Targets CNS Neurol Disord 1:319-330.
- Chang G, Spencer RH, Lee AT, Barclay MT, Rees DC. **1998.** *Structure of the MscL homolog from Mycobacterium tuberculosis: a gated mechanosensitive ion channel.* Science 282:2220-2226.
- Chang G, Roth CB. **2001.** *Structure of MscA from E. coli: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters.* Science 293:1793-1800.
- Chang HW, Neumann E. **1976.** *Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor proteins: release of calcium ions caused by acetylcholine binding.* Proc Natl Acad Sci U S A 73:3364-3368.

- Chang Y, Weiss DS. **1999**. *Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor*. *Nat Neurosci* 2:219-225.
- Changeux JP, Devillers-Thiery A, Chemouilli P. **1984**. *Acetylcholine receptor: an allosteric protein*. *Science* 225:1335-1345.
- Changeux JP, Edelstein SJ. **1998**. *Allosteric receptors after 30 years*. *Neuron* 21:959-980.
- Chatrenet B, Kotzba-Hibert F, Mulle C, Changeux JP, Goeldner MP, Hirth C. **1992**. *Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor*. *Mol Pharmacol* 41:1100-1106.
- Chen J, Zhang Y, Akk G, Sine S, Auerbach A. **1995**. *Activation kinetics of recombinant mouse nicotinic acetylcholine receptors: mutations of alpha-subunit tyrosine 190 affect both binding and gating*. *Biophys J* 69:849-859.
- Chiara DC, Cohen JB. **1997**. *Identification of amino acids contributing to high and low affinity d-tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor*. *J Biol Chem* 272:32940-32950.
- Chiara DC, Middleton RE, Cohen JB. **1998**. *Identification of tryptophan 55 as the primary site of [³H]nicotine photoincorporation in the gamma-subunit of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor*. *FEBS Lett* 423:223-226.
- Chiara DC, Xie Y, Cohen JB. **1999**. *Structure of the agonist-binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: affinity-labeling and mutational analyses identify gamma Tyr-111/delta Arg-113 as antagonist affinity determinants*. *Biochemistry* 38:6689-6698.
- Chiara DC, Trinidad JC, Wang D, Ziebell MR, Sullivan D, Cohen JB. **2003**. *Identification of amino acids in the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site and ion channel photolabeled by 4-[(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoylcholine, a novel photoaffinity antagonist*. *Biochemistry* 42:271-283.
- Chou KC. **2004**. *Insights from modelling the 3D structure of the extracellular domain of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*. *Biochem Biophys Res Commun* 319:433-438.
- Clements JD. **1996**. *Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function*. *Trends Neurosci* 19:163-171.
- Cohen BN, Labarca C, Davidson N, Lester HA. **1992**. *Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations*. *J Gen Physiol* 100:373-400.
- Cohen JB, Sharp SD, Liu WS. **1991**. *Structure of the agonist-binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. [³H]acetylcholine mustard identifies residues in the cation-binding subsite*. *J Biol Chem* 266:23354-23364.
- Colquhoun D, Sakmann B. **1985**. *Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate*. *J Physiol* 369:501-557.
- Colquhoun D. **1998**. *Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors*. *Br J Pharmacol* 125:924-947.
- Colquhoun D, Sivilotti LG. **2004**. *Function and structure in glycine receptors and some of their relatives*. *Trends Neurosci* 27:337-344.
- Connolly CN, Wafford KA. **2004**. *The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function*. *Biochem Soc Trans* 32:529-534.
- Conroy WG, Berg DK. **1995**. *Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions*. *J Biol Chem* 270:4424-4431.
- Conroy WG, Liu QS, Nai Q, Margiotta JF, Berg DK. **2003**. *Potentiation of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins*. *Mol Pharmacol* 63:419-428.

- Cooper E, Couturier S, Ballivet M. **1991**. *Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. *Nature* 350:235-238.
- Corbin J, Methot N, Wang HH, Baenziger JE, Blanton MP. **1998**. *Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy*. *J Biol Chem* 273:771-777.
- Corbin J, Wang HH, Blanton MP. **1998**. *Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [125I]azido-cholesterol*. *Biochim Biophys Acta* 1414:65-74.
- Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP. **2000**. *Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice*. *Trends Pharmacol Sci* 21:211-217.
- Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. **1998**. *Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. *J Neurosci* 18:648-657.
- Corringer PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. **1999**. *Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor*. *Neuron* 22:831-843.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. **2000**. *Nicotinic receptors at the amino acid level*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
- Costa V, Nistri A, Cavalli A, Carloni P. **2003**. *A structural model of agonist binding to the alpha3beta4 neuronal nicotinic receptor*. *Br J Pharmacol* 140:921-931.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. **1990**. *A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX*. *Neuron* 5:847-856.
- Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. **1992**. *Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins*. *Nature* 358:727-733.
- Cromer BA, Morton CJ, Parker MW. **2002**. *Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP*. *Trends Biochem Sci* 27:280-287.
- Curtis L, Buisson B, Bertrand S, Bertrand D. **2002**. *Potentiation of human alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol*. *Mol Pharmacol* 61:127-135.
- Czajkowski C, Karlin A. **1991**. *Agonist binding site of Torpedo electric tissue nicotinic acetylcholine receptor. A negatively charged region of the delta subunit within 0.9 nm of the alpha subunit binding site disulfide*. *J Biol Chem* 266:22603-22612.
- Czajkowski C, Kaufmann C, Karlin A. **1993**. *Negatively charged amino acid residues in the nicotinic receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6285-6289.
- Czajkowski C, Karlin A. **1995**. *Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding*. *J Biol Chem* 270:3160-3164.
- Damle VN, McLaughlin M, Karlin A. **1978**. *Bromoacetylcholine as an affinity label of the acetylcholine receptor from Torpedo californica*. *Biochem Biophys Res Commun* 84:845-851.
- Damle VN, Karlin A. **1980**. *Effects of agonists and antagonists on the reactivity of the binding site disulfide in acetylcholine receptor from Torpedo californica*. *Biochemistry* 19:3924-3932.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. **2001**. *A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca2+ channel Cav1.2*. *Science* 293:98-101.

- Dennis M, Giraudat J, Kotzyba-Hibert F, Goeldner M, Hirth C, Chang JY, Lazure C, Chretien M, Changeux JP. **1988**. *Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site*. Biochemistry 27:2346-2357.
- Devillers-Thiery A, Giraudat J, Bentaboulet M, Changeux JP. **1983**. *Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain*. Proc Natl Acad Sci U S A 80:2067-2071.
- Devillers-Thiery A, Galzi JL, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. **1992**. *Stratified organization of the nicotinic acetylcholine receptor channel*. Neuroreport 3:1001-1004.
- Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. **2002**. *beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes*. J Biol Chem 277:25056-25061.
- DiPaola M, Czajkowski C, Karlin A. **1989**. *The sidedness of the COOH terminus of the acetylcholine receptor delta subunit*. J Biol Chem 264:15457-15463.
- Dougherty DA, Stauffer DA. **1990**. *Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition*. Science 250:1558-1560.
- Dougherty DA. **1996**. *Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp*. Science 271:163-168.
- Dougherty DA, Lester HA. **2001**. *Neurobiology. Snails, synapses and smokers*. Nature 411:252-253, 255.
- Dougherty JJ, Wu J, Nichols RA. **2003**. *Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex*. J Neurosci 23:6740-6747.
- 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.
- Doyle DA. **2004**. *Structural changes during ion channel gating*. Trends Neurosci 27:298-302.
- Du C, Role LW. **2001**. *Differential modulation of nicotinic acetylcholine receptor subtypes and synaptic transmission in chick sympathetic ganglia by PGE(2)*. J Neurophysiol 85:2498-2508.
- Dudel J, Franke C. **1995**. *Evolution and desensitization of LGIC receptors*. Trends Neurosci 18:297-298; author reply 298-299.
- Dutertre S, Nicke A, Tyndall JD, Lewis RJ. **2004**. *Determination of alpha-conotoxin binding modes on neuronal nicotinic acetylcholine receptors*. J Mol Recognit 17:339-347.
- 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.
- Dutzler R. **2004**. *The structural basis of ClC chloride channel function*. Trends Neurosci 27:315-320.
- Edelstein SJ, Schaad O, Changeux JP. **1997**. *Single binding versus single channel recordings: a new approach to study ionotropic receptors*. Biochemistry 36:13755-13760.
- Eigen M. **1968**. *New looks and outlooks on physical enzymology*. Q Rev Biophys 1:3-33.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. **1993**. *Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities*. Nature 366:479-483.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. **1994**. *Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells*. Cell 79:705-715.

- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. **2001.** *alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 98:3501-3506.
- Engel AG, Ohno K, Sine SM. **2003.** *Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade.* Muscle Nerve 27:4-25.
- England PM, Zhang Y, Dougherty DA, Lester HA. **1999.** *Backbone mutations in transmembrane domains of a ligand-gated ion channel: implications for the mechanism of gating.* Cell 96:89-98.
- Espinoza-Fonseca LM. **2004.** *Base docking model of the homomeric alpha7 nicotinic receptor-beta-amyloid [Formula: see text] complex.* Biochem Biophys Res Commun 320:587-591.
- Faller M, Niederweis M, Schulz GE. **2004.** *The structure of a mycobacterial outer-membrane channel.* Science 303:1189-1192.
- Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. **1998.** *Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide.* Science 282:2215-2220.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. **2004.** *Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center.* Science 303:1831-1838.
- Fischer M, Corringer PJ, Schott K, Bacher A, Changeux JP. **2001.** *A method for soluble overexpression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain.* Proc Natl Acad Sci U S A 98:3567-3570.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. **1992.** *A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment.* Mol Pharmacol 41:31-37.
- Forst D, Welte W, Wacker T, Diederichs K. **1998.** *Structure of the sucrose-specific porin ScrY from Salmonella typhimurium and its complex with sucrose.* Nat Struct Biol 5:37-46.
- Fruchart-Gaillard C, Gilquin B, Antil-Delbeke S, Le Novere N, Tamiya T, Corringer PJ, Changeux JP, Menez A, Servent D. **2002.** *Experimentally based model of a complex between a snake toxin and the alpha 7 nicotinic receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 99:3216-3221.
- Fu D, Libson A, Stroud R. **2002.** *The structure of GlpF, a glycerol conducting channel.* Novartis Found Symp 245:51-61; discussion 61-55, 165-168.
- Fu W, Jhamandas JH. **2003.** *Beta-amyloid peptide activates non-alpha7 nicotinic acetylcholine receptors in rat basal forebrain neurons.* J Neurophysiol 90:3130-3136.
- Gallagher MJ, Cohen JB. **1999.** *Identification of amino acids of the torpedo nicotinic acetylcholine receptor contributing to the binding site for the noncompetitive antagonist [(3)H]tetracaine.* Mol Pharmacol 56:300-307.
- Gallagher MJ, Chiara DC, Cohen JB. **2001.** *Interactions between 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[(125)I]iodophenyl)diazirine and tetracaine, phencyclidine, or histrionicotoxin in the Torpedo series nicotinic acetylcholine receptor ion channel.* Mol Pharmacol 59:1514-1522.
- Galzi JL, Revah F, Black D, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. **1990.** *Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites.* J Biol Chem 265:10430-10437.
- Galzi JL, Revah F, Bouet F, Menez A, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. **1991.** *Allosteric transitions of the acetylcholine receptor probed at the amino acid level with a photolabile cholinergic ligand.* Proc Natl Acad Sci U S A 88:5051-5055.

- Galzi JL, Devillers-Thiery A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. **1992**. *Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic*. Nature 359:500-505.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D. **1996**. *Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. Embo J 15:5824-5832.
- Garbus I, Roccamo AM, Barrantes FJ. **2002**. *Identification of threonine 422 in transmembrane domain alpha M4 of the nicotinic acetylcholine receptor as a possible site of interaction with hydrocortisone*. Neuropharmacology 43:65-73.
- Gill CH, Peters JA, Lambert JJ. **1995**. *An electrophysiological investigation of the properties of a murine recombinant 5-HT3 receptor stably expressed in HEK 293 cells*. Br J Pharmacol 114:1211-1221.
- Giraudat J, Montecucco C, Bisson R, Changeux JP. **1985**. *Transmembrane topology of acetylcholine receptor subunits probed with photoreactive phospholipids*. Biochemistry 24:3121-3127.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Chang JY, Changeux JP. **1986**. *Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine-262 of the delta subunit is labeled by [3H]chlorpromazine*. Proc Natl Acad Sci U S A 83:2719-2723.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Haumont PY, Lederer F, Changeux JP. **1987**. *Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [3H]chlorpromazine labels homologous residues in the beta and delta chains*. Biochemistry 26:2410-2418.
- Giraudat J, Gali J, Revah F, Changeux J, Haumont P, Lederer F. **1989**. *The noncompetitive blocker [(3)H]chlorpromazine labels segment M2 but not segment M1 of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit*. FEBS Lett 253:190-198.
- Goeldner MP, Hirth CG. **1980**. *Specific photoaffinity labeling induced by energy transfer: application to irreversible inhibition of acetylcholinesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A 77:6439-6442.
- Gotti C, Hanke W, Maury K, Moretti M, Ballivet M, Clementi F, Bertrand D. **1994**. *Pharmacology and biophysical properties of alpha 7 and alpha 7-alpha 8 alpha-bungarotoxin receptor subtypes immunopurified from the chick optic lobe*. Eur J Neurosci 6:1281-1291.
- Grant MA, Gentile LN, Shi QL, Pellegrini M, Hawrot E. **1999**. *Expression and spectroscopic analysis of soluble nicotinic acetylcholine receptor fragments derived from the extracellular domain of the alpha-subunit*. Biochemistry 38:10730-10742.
- Grassi F, Palma E, Tonini R, Amici M, Ballivet M, Eusebi F. **2003**. *Amyloid beta(1-42) peptide alters the gating of human and mouse alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors*. J Physiol 547:147-157.
- Grosman C, Auerbach A. **2000**. *Kinetic, mechanistic, and structural aspects of unliganded gating of acetylcholine receptor channels: a single-channel study of second transmembrane segment 12' mutants*. J Gen Physiol 115:621-635.
- Grosman C, Salamone FN, Sine SM, Auerbach A. **2000**. *The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element*. J Gen Physiol 116:327-340.
- Grosman C, Zhou M, Auerbach A. **2000**. *Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating*. Nature 403:773-776.
- Grosman C, Auerbach A. **2001**. *The dissociation of acetylcholine from open nicotinic receptor channels*. Proc Natl Acad Sci U S A 98:14102-14107.

- Grutter T, Ehret-Sabatier L, Kotzyba-Hibert F, Goeldner M. **2000**. *Photoaffinity labeling of Torpedo nicotinic receptor with the agonist [3H]DCTA: identification of amino acid residues which contribute to the binding of the ester moiety of acetylcholine*. Biochemistry 39:3034-3043.
- Grutter T, Changeux JP. **2001**. *Nicotinic receptors in wonderland*. Trends Biochem Sci 26:459-463.
- Grutter T, Bertrand S, Kotzyba-Hibert F, Bertrand D, Goeldner M. **2002**. *Structural reorganization of the acetylcholine binding site of the torpedo nicotinic receptor as revealed by dynamic photoaffinity labeling*. Chembiochem 3:652-658.
- Grutter T, Prado de Carvalho L, Le Novere N, Corringer PJ, Edelstein S, Changeux JP. **2003**. *An H-bond between two residues from different loops of the acetylcholine binding site contributes to the activation mechanism of nicotinic receptors*. Embo J 22:1990-2003.
- Gu Y, Hall ZW. **1988**. *Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle*. Neuron 1:117-125.
- Gunthorpe MJ, Lummis SC. **2001**. *Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily*. J Biol Chem 276:10977-10983.
- Hansen SB, Radic Z, Talley TT, Molles BE, Deerinck T, Tsigelny I, Taylor P. **2002**. *Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein*. J Biol Chem 277:41299-41302.
- Hansen SB, Talley TT, Radic Z, Taylor P. **2004**. *Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from Aplysia californica*. J Biol Chem 279:24197-24202.
- Harel M, Kasher R, Nicolas A, Guss JM, Balass M, Fridkin M, Smit AB, Brejc K, Sixma TK, Katchalski-Katzir E, Sussman JL, Fuchs S. **2001**. *The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the X-Ray structure of a complex between alpha-bungarotoxin and a mimotope peptide*. Neuron 32:265-275.
- Heidmann T, Changeux JP. **1979**. *Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites*. Eur J Biochem 94:281-296.
- Heidmann T, Changeux JP. **1980**. *Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata in the millisecond time range: resolution of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects*. Biochem Biophys Res Commun 97:889-896.
- Heidmann T, Bernhardt J, Neumann E, Changeux JP. **1983**. *Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from Torpedo marmorata*. Biochemistry 22:5452-5459.
- Heidmann T, Changeux JP. **1984**. *Time-resolved photolabeling by the noncompetitive blocker chlorpromazine of the acetylcholine receptor in its transiently open and closed ion channel conformations*. Proc Natl Acad Sci U S A 81:1897-1901.
- Horenstein J, Wagner DA, Czajkowski C, Akabas MH. **2001**. *Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment*. Nat Neurosci 4:477-485.
- Horton RM, Manfredi AA, Conti-Tronconi BM. **1993**. *The 'embryonic' gamma subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is expressed in adult extraocular muscle*. Neurology 43:983-986.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG. **2003**. *Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity*. Nat Neurosci 6:362-369.
- Hsiao B, Dweck D, Luetje CW. **2001**. *Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc*. J Neurosci 21:1848-1856.

- Hsu KS. **1994.** *Modulation of the nicotinic acetylcholine receptor channels by spermine in Xenopus muscle cell culture.* Neurosci Lett 182:99-103.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. **2003.** *Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from Escherichia coli.* Science 301:616-620.
- Hucho F, Oberthur W, Lottspeich F. **1986.** *The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits.* FEBS Lett 205:137-142.
- Huebsch KA, Maimone MM. **2003.** *Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits.* J Neurobiol 54:486-501.
- Ibanez-Tallon I, Miwa JM, Wang HL, Adams NC, Crabtree GW, Sine SM, Heintz N. **2002.** *Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin lynx1.* Neuron 33:893-903.
- Igusa Y. **1988.** *Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured Xenopus myotomal muscle cells.* J Physiol 405:169-185.
- Imoto K, Methfessel C, Sakmann B, Mishina M, Mori Y, Konno T, Fukuda K, Kurasaki M, Bujo H, Fujita Y, et al. **1986.** *Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel.* Nature 324:670-674.
- Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S. **1988.** *Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance.* Nature 335:645-648.
- Imoto K, Konno T, Nakai J, Wang F, Mishina M, Numa S. **1991.** *A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor.* FEBS Lett 289:193-200.
- Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G, Rees DC. **1999.** *Structure of the Escherichia coli fumarate reductase respiratory complex.* Science 284:1961-1966.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. **1995.** *Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans.* Nature 376:660-669.
- Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. **1998.** *Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex.* Science 281:64-71.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. **2002.** *Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel.* Nature 417:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. **2002.** *The open pore conformation of potassium channels.* Nature 417:523-526.
- 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.
- Johnson DA, Voet JG, Taylor P. **1984.** *Fluorescence energy transfer between cobra alpha-toxin molecules bound to the acetylcholine receptor.* J Biol Chem 259:5717-5725.
- Jones AK, Elgar G, Sattelle DB. **2003.** *The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, Fugu rubripes.* Genomics 82:441-451.
- Jones AK, Sattelle DB. **2004.** *Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, Caenorhabditis elegans.* Bioessays 26:39-49.
- Jones MV, Westbrook GL. **1996.** *The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission.* Trends Neurosci 19:96-101.
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N. **2001.** *Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution.* Nature 411:909-917.
- Jormakka M, Tornroth S, Byrne B, Iwata S. **2002.** *Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N.* Science 295:1863-1868.

- Kao PN, Dwork AJ, Kaldany RR, Silver ML, Wideman J, Stein S, Karlin A. **1984**. *Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site*. J Biol Chem 259:11662-11665.
- Karlin A. **2002**. *Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors*. Nat Rev Neurosci 3:102-114.
- Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, Piechan JL, Ruble CL, Mills CJ, Schellin KA, Slightom JL, Fitzgerald LR, Benjamin CW, Roberds SL. **2003**. *A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3*. Gene 319:137-148.
- Karpen JW, Ruiz M. **2002**. *Ion channels: does each subunit do something on its own?* Trends Biochem Sci 27:402-409.
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL. **2003**. *Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor*. Nature 421:272-275.
- Katz B, Thesleff S. **1957**. *A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate*. J Physiol 138:63-80.
- Kelley SP, Dunlop JI, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. **2003**. *A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors*. Nature 424:321-324.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, French CR, Schofield PR, Barry PH. **2000**. *M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective*. Biophys J 79:247-259.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Pierce KD, Schofield PR, Barry PH. **2002**. *Cation-selective mutations in the M2 domain of the inhibitory glycine receptor channel reveal determinants of ion-charge selectivity*. J Gen Physiol 119:393-410.
- Keyser KT, Britto LR, Schoepfer R, Whiting P, Cooper J, Conroy W, Brozowska-Precht A, Karten HJ, Lindstrom J. **1993**. *Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina*. J Neurosci 13:442-454.
- Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, Lester HA. **2000**. *State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels*. Nature 406:405-410.
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL. **2002**. *Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels*. J Physiol 540:425-434.
- Kieffer B, Goeldner M, Hirth C, Aebersold R, Chang JY. **1986**. *Sequence determination of a peptide fragment from electric eel acetylcholinesterase, involved in the binding of quaternary ammonium*. FEBS Lett 202:91-96.
- Kienker P, Tomaselli G, Jurman M, Yellen G. **1994**. *Conductance mutations of the nicotinic acetylcholine receptor do not act by a simple electrostatic mechanism*. Biophys J 66:325-334.
- Kim J, McNamee MG. **1998**. *Topological disposition of Cys 222 in the alpha-subunit of nicotinic acetylcholine receptor analyzed by fluorescence-quenching and electron paramagnetic resonance measurements*. Biochemistry 37:4680-4686.
- Kolbe M, Besir H, Essen LO, Oesterhelt D. **2000**. *Structure of the light-driven chloride pump halorhodopsin at 1.8 Å resolution*. Science 288:1390-1396.
- Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. **2000**. *Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export*. Nature 405:914-919.
- Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. **1966**. *Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits*. Biochemistry 5:365-385.
- Kotzyba-Hibert F, Kessler P, Zerbib V, Grutter T, Bogen C, Takeda K, Hammadi A, Knerr L, Goeldner M. **1997**. *Nicotinic acetylcholine receptor labeled with a tritiated, photoactivatable agonist: a new tool for investigating the functional, activated state*. Bioconjug Chem 8:472-480.

- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer PJ, Galzi JL, Changeux JP, Bertrand D. **1998**. *Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. Mol Pharmacol 53:283-294.
- Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J, Unwin N. **1987**. *Location of subunits within the acetylcholine receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata**. J Cell Biol 105:9-18.
- Kuhlmann J, Okonjo KO, Maelicke A. **1991**. *Desensitization is a property of the cholinergic binding region of the nicotinic acetylcholine receptor, not of the receptor-integral ion channel*. FEBS Lett 279:216-218.
- 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.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM, Ezaki T, Doyle DA. **2003**. *Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state*. Science 300:1922-1926.
- Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA. **2003**. *Structure of the cytochrome b6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity*. Science 302:1009-1014.
- Lancaster CR, Kroger A, Auer M, Michel H. **1999**. *Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution*. Nature 402:377-385.
- Langenbuch-Cachet J, Bon C, Mulle C, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. **1988**. *Photoaffinity labeling of the acetylcholine binding sites on the nicotinic receptor by an aryldiazonium derivative*. Biochemistry 27:2337-2345.
- Le Novere N, Changeux JP. **1995**. *Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells*. J Mol Evol 40:155-172.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP. **1999**. *Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation*. Biophys J 76:2329-2345.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP. **2002**. *The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences*. J Neurobiol 53:447-456.
- Le Novere N, Grutter T, Changeux JP. **2002**. *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca^{2+} -binding sites*. Proc Natl Acad Sci U S A 99:3210-3215.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. **2002**. *Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor*. Cell 111:219-230.
- Leite JF, Blanton MP, Shahgholi M, Dougherty DA, Lester HA. **2003**. *Conformation-dependent hydrophobic photolabeling of the nicotinic receptor: electrophysiology-coordinated photochemistry and mass spectrometry*. Proc Natl Acad Sci U S A 100:13054-13059.
- Leonard RJ, Labarca CG, Charnet P, Davidson N, Lester HA. **1988**. *Evidence that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel pore of the nicotinic receptor*. Science 242:1578-1581.
- Leonard RJ, Charnet P, Labarca C, Vogelaar NJ, Czyzyk L, Gouin A, Davidson N, Lester HA. **1991**. *Reverse pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor. Mapping the local anesthetic binding site*. Ann N Y Acad Sci 625:588-599.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA. **2004**. *Cys-loop receptors: new twists and turns*. Trends Neurosci 27:329-336.

- Li L, Schuchard M, Palma A, Pradier L, McNamee MG. **1990.** *Functional role of the cysteine 451 thiol group in the M4 helix of the gamma subunit of Torpedo californica acetylcholine receptor.* Biochemistry 29:5428-5436.
- Lindstrom J. **2002.** *Autoimmune diseases involving nicotinic receptors.* J Neurobiol 53:656-665.
- Liu DM, Cuevas J, Adams DJ. **2000.** *VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation.* Eur J Neurosci 12:2243-2251.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. **2000.** *Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors.* Nature 403:274-280.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK. **2001.** *beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A 98:4734-4739.
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W. **2004.** *Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution.* Nature 428:287-292.
- Locher KP, Lee AT, Rees DC. **2002.** *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism.* Science 296:1091-1098.
- Luecke H, Schobert B, Lanyi JK, Spudich EN, Spudich JL. **2001.** *Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction.* Science 293:1499-1503.
- Lugovskoy AA, Maslennikov IV, Utkin YN, Tsetlin VI, Cohen JB, Arseniev AS. **1998.** *Spatial structure of the M3 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit.* Eur J Biochem 255:455-461.
- Machold J, Utkin Y, Kirsch D, Kaufmann R, Tsetlin V, Hucho F. **1995.** *Photolabeling reveals the proximity of the alpha-neurotoxin binding site to the M2 helix of the ion channel in the nicotinic acetylcholine receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 92:7282-7286.
- Maimone MM, Merlie JP. **1993.** *Interaction of the 43 kd postsynaptic protein with all subunits of the muscle nicotinic acetylcholine receptor.* Neuron 11:53-66.
- Maksay G, Bikadi Z, Simonyi M. **2003.** *Binding interactions of antagonists with 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor models.* J Recept Signal Transduct Res 23:255-270.
- Margiotta JF, Pardi D. **1995.** *Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptors mediate cyclic AMP-dependent enhancement of neuronal acetylcholine sensitivity.* Mol Pharmacol 48:63-71.
- Marquez J, Iriarte A, Martinez-Carrion M. **1989.** *Covalent modification of a critical sulfhydryl group in the acetylcholine receptor: cysteine-222 of the alpha-subunit.* Biochemistry 28:7433-7439.
- Matsubara N, Billington AP, Hess GP. **1992.** *How fast does an acetylcholine receptor channel open? Laser-pulse photolysis of an inactive precursor of carbamoylcholine in the microsecond time region with BC3H1 cells.* Biochemistry 31:5507-5514.
- Mayer ML, Olson R, Gouaux E. **2001.** *Mechanisms for ligand binding to GluR0 ion channels: crystal structures of the glutamate and serine complexes and a closed apo state.* J Mol Biol 311:815-836.
- McCrea PD, Popot JL, Engelman DM. **1987.** *Transmembrane topography of the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit.* Embo J 6:3619-3626.
- McLaughlin JT, Hawrot E, Yellen G. **1995.** *Covalent modification of engineered cysteines in the nicotinic acetylcholine receptor agonist-binding domain inhibits receptor activation.* Biochem J 310 (Pt 3):765-769.
- Methot N, Ritchie BD, Blanton MP, Baenziger JE. **2001.** *Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel.* J Biol Chem 276:23726-23732.

- Middleton RE, Cohen JB. **1991**. *Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label*. *Biochemistry* 30:6987-6997.
- Middleton RE, Strnad NP, Cohen JB. **1999**. *Photoaffinity labeling the torpedo nicotinic acetylcholine receptor with [(3)H]tetracaine, a nondesensitizing noncompetitive antagonist*. *Mol Pharmacol* 56:290-299.
- Mileo AM, Monaco L, Palma E, Grassi F, Miledi R, Eusebi F. **1995**. *Two forms of acetylcholine receptor gamma subunit in mouse muscle*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2686-2690.
- Millar NS. **2003**. *Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors*. *Biochem Soc Trans* 31:869-874.
- Min CK, Weiland GA. **1993**. *Effects of substance P on the binding of agonists to the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electroplaque*. *J Neurochem* 60:2238-2246.
- Min CK, Owens J, Weiland GA. **1994**. *Characterization of the binding of [3H]substance P to the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electroplaque*. *Mol Pharmacol* 45:221-227.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. **1999**. *Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall*. *J Mol Biol* 288:765-786.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. **2003**. *Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore*. *Nature* 423:949-955.
- Moise L, Piserchio A, Basus VJ, Hawrot E. **2002**. *NMR structural analysis of alpha-bungarotoxin and its complex with the principal alpha-neurotoxin-binding sequence on the alpha 7 subunit of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor*. *J Biol Chem* 277:12406-12417.
- Molles BE, Tsigelny I, Nguyen PD, Gao SX, Sine SM, Taylor P. **2002**. *Residues in the epsilon subunit of the nicotinic acetylcholine receptor interact to confer selectivity of waglerin-1 for the alpha-epsilon subunit interface site*. *Biochemistry* 41:7895-7906.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. **1965**. *On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model*. *J Mol Biol* 12:88-118.
- Montal M, Opella SJ. **2002**. *The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor*. *Biochim Biophys Acta* 1565:287-293.
- Moore MA, McCarthy MP. **1995**. *Snake venom toxins, unlike smaller antagonists, appear to stabilize a resting state conformation of the nicotinic acetylcholine receptor*. *Biochim Biophys Acta* 1235:336-342.
- Mozrzymas JW, Ruzzier F. **1992**. *ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres*. *Neurosci Lett* 139:217-220.
- Mu TW, Lester HA, Dougherty DA. **2003**. *Different binding orientations for the same agonist at homologous receptors: a lock and key or a simple wedge?* *J Am Chem Soc* 125:6850-6851.
- Mulle C, Lena C, Changeux JP. **1992**. *Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons*. *Neuron* 8:937-945.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. **2002**. *Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB*. *Nature* 419:587-593.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. **2000**. *Structural determinants of water permeation through aquaporin-1*. *Nature* 407:599-605.
- Nachon F, Ehret-Sabatier L, Loew D, Colas C, van Dorsselaer A, Goeldner M. **1998**. *Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF*. *Biochemistry* 37:10507-10513.

- Naranjo D, Brehm P. **1993**. *Modal shifts in acetylcholine receptor channel gating confer subunit-dependent desensitization*. Science 260:1811-1814.
- Neher E, Sakmann B. **1976**. *Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres*. Nature 260:799-802.
- Neubig RR, Cohen JB. **1979**. *Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions*. Biochemistry 18:5464-5475.
- Nevin ST, Cromer BA, Haddrill JL, Morton CJ, Parker MW, Lynch JW. **2003**. *Insights into the structural basis for zinc inhibition of the glycine receptor*. J Biol Chem 278:28985-28992.
- Nirathanan S, Gwee MC. **2004**. *Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on*. J Pharmacol Sci 94:1-17.
- Nishida M, MacKinnon R. **2002**. *Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution*. Cell 111:957-965.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. **1983**. *Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences*. Nature 301:251-255.
- 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.
- Oberthur W, Muhn P, Baumann H, Lottspeich F, Wittmann-Liebold B, Hucho F. **1986**. *The reaction site of a non-competitive antagonist in the delta-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor*. Embo J 5:1815-1819.
- Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG. **1989**. *Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators*. Cell Mol Neurobiol 9:141-178.
- Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, Engel AG. **1995**. *Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit*. Proc Natl Acad Sci U S A 92:758-762.
- Okonjo KO, Kuhlmann J, Maelicke A. **1991**. *A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel*. Eur J Biochem 200:671-677.
- Opella SJ, Marassi FM, Gesell JJ, Valente AP, Kim Y, Oblatt-Montal M, Montal M. **1999**. *Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy*. Nat Struct Biol 6:374-379.
- Ortells MO, Lunt GG. **1995**. *Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors*. Trends Neurosci 18:121-127.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. **2000**. *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science 289:739-745.
- Papineni RV, Sanchez JU, Baksi K, Willcockson IU, Pedersen SE. **2001**. *Site-specific charge interactions of alpha-conotoxin M1 with the nicotinic acetylcholine receptor*. J Biol Chem 276:23589-23598.
- Pashkov VS, Maslennikov IV, Tchikin LD, Efremov RG, Ivanov VT, Arseniev AS. **1999**. *Spatial structure of the M2 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit*. FEBS Lett 457:117-121.
- Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM. **1997**. *X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases*. Science 277:1676-1681.

- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. **2003**. *Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyattractyloside*. *Nature* 426:39-44.
- Pedersen SE, Cohen JB. **1990**. *d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2785-2789.
- Pedersen SE, Sharp SD, Liu WS, Cohen JB. **1992**. *Structure of the noncompetitive antagonist-binding site of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. [3H]meproadifen mustard reacts selectively with alpha-subunit Glu-262*. *J Biol Chem* 267:10489-10499.
- Pereira EF, Alkondon M, Tano T, Castro NG, Froes-Ferrao MM, Rozental R, Aronstam RS, Schrattenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX. **1993**. *A novel agonist binding site on nicotinic acetylcholine receptors*. *J Recept Res* 13:413-436.
- Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX. **2002**. *Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors*. *J Neurobiol* 53:479-500.
- Petersson EJ, Choi A, Dahan DS, Lester HA, Dougherty DA. **2002**. *A perturbed pK(a) at the binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: implications for nicotine binding*. *J Am Chem Soc* 124:12662-12663.
- Popot JL, Changeux JP. **1984**. *Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein*. *Physiol Rev* 64:1162-1239.
- Pratt MB, Husain SS, Miller KW, Cohen JB. **2000**. *Identification of sites of incorporation in the nicotinic acetylcholine receptor of a photoactivatable general anesthetic*. *J Biol Chem* 275:29441-29451.
- Pratt MB, Pedersen SE, Cohen JB. **2000**. *Identification of the sites of incorporation of [3H]ethidium diazide within the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel*. *Biochemistry* 39:11452-11462.
- Price KL, Lummis SC. **2004**. *The role of tyrosine residues in the extracellular domain of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor*. *J Biol Chem* 279:23294-23301.
- Prince RJ, Sine SM. **1996**. *Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor. Identification of residues that determine agonist selectivity*. *J Biol Chem* 271:25770-25777.
- Prince RJ, Sine SM. **1998**. *Epibatidine binds with unique site and state selectivity to muscle nicotinic acetylcholine receptors*. *J Biol Chem* 273:7843-7849.
- Psaridi-Linardaki L, Mamalaki A, Remoundos M, Tzartos SJ. **2002**. *Expression of soluble ligand- and antibody-binding extracellular domain of human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in yeast Pichia pastoris. Role of glycosylation in alpha-bungarotoxin binding*. *J Biol Chem* 277:26980-26986.
- Quick MW, Lester RA. **2002**. *Desensitization of neuronal nicotinic receptors*. *J Neurobiol* 53:457-478.
- Rana TM, Meares CF. **1991**. *Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10578-10582.
- Reeves DC, Sayed MF, Chau PL, Price KL, Lummis SC. **2003**. *Prediction of 5-HT₃ receptor agonist-binding residues using homology modeling*. *Biophys J* 84:2338-2344.
- Reitstetter R, Lukas RJ, Gruener R. **1999**. *Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure*. *J Pharmacol Exp Ther* 289:656-660.
- Revah F, Galzi JL, Giraudat J, Haumont PY, Lederer F, Changeux JP. **1990**. *The noncompetitive blocker [3H]chlorpromazine labels three amino acids of the acetylcholine receptor gamma subunit: implications for the alpha-helical organization*

- of regions MII and for the structure of the ion channel*. Proc Natl Acad Sci U S A 87:4675-4679.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. **1991**. *Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor*. Nature 353:846-849.
- Role LW, Berg DK. **1996**. *Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses*. Neuron 16:1077-1085.
- Rozental R, Scoble GT, Albuquerque EX, Idriss M, Sherby S, Sattelle DB, Nakanishi K, Konno K, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. **1989**. *Allosteric inhibition of nicotinic acetylcholine receptors of vertebrates and insects by philanthotoxin*. J Pharmacol Exp Ther 249:123-130.
- Rozycka A, Trzeciak WH. **2003**. *Genetic basis of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy*. J Appl Genet 44:197-207.
- Ruiz ML, Karpen JW. **1997**. *Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states*. Nature 389:389-392.
- Ryan SE, Demers CN, Chew JP, Baenziger JE. **1996**. *Structural effects of neutral and anionic lipids on the nicotinic acetylcholine receptor. An infrared difference spectroscopy study*. J Biol Chem 271:24590-24597.
- Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C. **1994**. *Trp279 is involved in the binding of quaternary ammonium at the peripheral site of Torpedo marmorata acetylcholinesterase*. Eur J Biochem 219:155-159.
- Schapira M, Abagyan R, Totrov M. **2002**. *Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine*. BMC Struct Biol 2:1.
- Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenbusch JP. **1995**. *Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution*. Science 267:512-514.
- Schrattenholz A, Godovac-Zimmermann J, Schafer HJ, Albuquerque EX, Maelicke A. **1993**. *Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine*. Eur J Biochem 216:671-677.
- Schrattenholz A, Pereira EF, Roth U, Weber KH, Albuquerque EX, Maelicke A. **1996**. *Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands*. Mol Pharmacol 49:1-6.
- Schrattenholz A, Roth U, Godovac-Zimmermann J, Maelicke A. **1997**. *Mapping of a binding site for ATP within the extracellular region of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit*. Biochemistry 36:13333-13340.
- Schrattenholz A, Pfeiffer S, Pejovic V, Rudolph R, Godovac-Zimmermann J, Maelicke A. **1998**. *Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of torpedo nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit*. J Biol Chem 273:32393-32399.
- Severance E, Zhang H, Cruz Y, Pakhlevanians S, Hadley SH, Amin J, Wecker L, Reed C, Cuevas J. **2004**. *THE {alpha}7 NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNIT EXISTS IN TWO ISOFORMS THAT CONTRIBUTE TO FUNCTIONAL LIGAND-GATED ION CHANNELS**. Mol Pharmacol.
- Sgard F, Charpantier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F. **2002**. *A novel human nicotinic receptor subunit, alpha10, that confers functionality to the alpha9-subunit*. Mol Pharmacol 61:150-159.
- Shao Z, Mellor IR, Brierley MJ, Harris J, Usherwood PN. **1998**. *Potentiation and inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by spermine in the TE671 human muscle cell line*. J Pharmacol Exp Ther 286:1269-1276.
- Shaw KP, Aracava Y, Akaike A, Daly JW, Rickett DL, Albuquerque EX. **1985**. *The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist*

- effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex.* Mol Pharmacol 28:527-538.
- Shen XM, Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Gingold M, Sine SM, Engel AG. **2003.** *Mutation causing severe myasthenia reveals functional asymmetry of AChR signature cystine loops in agonist binding and gating.* J Clin Invest 111:497-505.
- Simasko SM, Soares JR, Weiland GA. **1986.** *Two components of carbamylcholine-induced loss of nicotinic acetylcholine receptor function in the neuronal cell line PC12.* Mol Pharmacol 30:6-12.
- Simasko SM, Durkin JA, Weiland GA. **1987.** *Effects of substance P on nicotinic acetylcholine receptor function in PC12 cells.* J Neurochem 49:253-260.
- Sine SM. **1993.** *Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity.* Proc Natl Acad Sci U S A 90:9436-9440.
- Sine SM, Kreienkamp HJ, Bren N, Maeda R, Taylor P. **1995.** *Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity.* Neuron 15:205-211.
- Sine SM, Wang HL, Bren N. **2002.** *Lysine scanning mutagenesis delineates structural model of the nicotinic receptor ligand binding domain.* J Biol Chem 277:29210-29223.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedragger B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. **2001.** *A gliaderived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission.* Nature 411:261-268.
- Smit AB, Brejc K, Syed N, Sixma TK. **2003.** *Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor.* Ann N Y Acad Sci 998:81-92.
- Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R. **2001.** *Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons.* J Neurosci 21:4958-4968.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. **1996.** *Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore.* Science 274:1859-1866.
- Song XZ, Pedersen SE. **2000.** *Electrostatic interactions regulate desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor.* Biophys J 78:1324-1334.
- Song XZ, Andreeva IE, Pedersen SE. **2003.** *Site-selective agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica.* Biochemistry 42:4197-4207.
- Spivak CE. **1995.** *Correlations among Hill parameters reflect models of activating ligand-gated ion channels.* Trends Pharmacol Sci 16:39-42.
- Spura A, Russin TS, Freedman ND, Grant M, McLaughlin JT, Hawrot E. **1999.** *Probing the agonist domain of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis reveals residues in proximity to the alpha-bungarotoxin binding site.* Biochemistry 38:4912-4921.
- Stafford GA, Oswald RE, Weiland GA. **1994.** *The beta subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors is a determinant of the affinity for substance P inhibition.* Mol Pharmacol 45:758-762.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE. **1999.** *Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase.* Science 286:1700-1705.
- Storch A, Schrattenholz A, Cooper JC, Abdel Ghani EM, Gutbrod O, Weber KH, Reinhardt S, Lobron C, Hermesen B, Soskic V, et al. **1995.** *Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells.* Eur J Pharmacol 290:207-219.

- Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D. **2003**. *An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex*. Nature 426:413-418.
- Sukharev S, Anishkin A. **2004**. *Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems?* Trends Neurosci 27:345-351.
- Sullivan D, Chiara DC, Cohen JB. **2002**. *Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis: antagonist footprint and secondary structure prediction*. Mol Pharmacol 61:463-472.
- Sullivan DA, Cohen JB. **2000**. *Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. Orientation requirements for activation by covalent agonist*. J Biol Chem 275:12651-12660.
- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. **1991**. *Atomic structure of acetylcholinesterase from Torpedo californica: a prototypic acetylcholine-binding protein*. Science 253:872-879.
- Swope SL, Qu Z, Haganir RL. **1995**. *Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases*. Ann N Y Acad Sci 757:197-214.
- Takacs Z, Wilhelmsen KC, Sorota S. **2001**. *Snake alpha-neurotoxin binding site on the Egyptian cobra (Naja haje) nicotinic acetylcholine receptor Is conserved*. Mol Biol Evol 18:1800-1809.
- Tamamizu S, Guzman GR, Santiago J, Rojas LV, McNamee MG, Lasalde-Dominicci JA. **2000**. *Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor*. Biochemistry 39:4666-4673.
- Tierney ML, Unwin N. **2000**. *Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor*. J Mol Biol 303:185-196.
- Tonini R, Renzi M, Eusebi F. **2004**. *Unliganded human mutant alpha 7 nicotinic receptors are modulated by Ca²⁺ and trace levels of Zn²⁺*. Neuropharmacology 46:727-733.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. **2000**. *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*. Nature 405:647-655.
- Trudell J. **2002**. *Unique assignment of inter-subunit association in GABA(A) alpha 1 beta 3 gamma 2 receptors determined by molecular modeling*. Biochim Biophys Acta 1565:91-96.
- Tsetlin VI, Dergousova NI, Azeeva EA, Kryukova EV, Kudelina IA, Shibanova ED, Kasheverov IE, Methfessel C. **2002**. *Refolding of the Escherichia coli expressed extracellular domain of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor*. Eur J Biochem 269:2801-2809.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. **1996**. *The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å*. Science 272:1136-1144.
- Tzartos SJ, Cung MT, Demange P, Loutrari H, Mamalaki A, Marraud M, Papadouli I, Sakarellos C, Tsikaris V. **1991**. *The main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies*. Mol Neurobiol 5:1-29.
- Unwin N. **1993**. *Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution*. J Mol Biol 229:1101-1124.
- Unwin N. **1995**. *Acetylcholine receptor channel imaged in the open state*. Nature 373:37-43.
- Unwin N, Miyazawa A, Li J, Fujiyoshi Y. **2002**. *Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits*. J Mol Biol 319:1165-1176.
- Unwin N. **2003**. *Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy*. FEBS Lett 555:91-95.

- Valenzuela CF, Dowding AJ, Arias HR, Johnson DA. **1994.** *Antibody-induced conformational changes in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: a fluorescence study.* Biochemistry 33:6586-6594.
- Valera S, Ballivet M, Bertrand D. **1992.** *Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 89:9949-9953.
- Valor LM, Mulet J, Sala F, Sala S, Ballesta JJ, Criado M. **2002.** *Role of the large cytoplasmic loop of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function.* Biochemistry 41:7931-7938.
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. **2004.** *X-ray structure of a protein-conducting channel.* Nature 427:36-44.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. **1992.** *Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors.* Neuron 8:127-134.
- Villarroel A, Herlitze S, Koenen M, Sakmann B. **1991.** *Location of a threonine residue in the alpha-subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel.* Proc R Soc Lond B Biol Sci 243:69-74.
- Villarroel A, Sakmann B. **1992.** *Threonine in the selectivity filter of the acetylcholine receptor channel.* Biophys J 62:196-205; discussion 205-198.
- Wang D, Chiara DC, Xie Y, Cohen JB. **2000.** *Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with 4-benzoylbenzoylcholine, a novel photoaffinity competitive antagonist.* J Biol Chem 275:28666-28674.
- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. **2000.** *beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology.* J Biol Chem 275:5626-5632.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. **2000.** *Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors.* J Neurochem 75:1155-1161.
- Weber M, Changeux JP. **1974.** *Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. II. Effect of cholinergic agonists and antagonists on the binding of the tritiated alpha-neurotoxin.* Mol Pharmacol 10:15-34.
- Webster SM, Del Camino D, Dekker JP, Yellen G. **2004.** *Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges.* Nature 428:864-868.
- Weiland G, Frisman D, Taylor P. **1979.** *Affinity labeling of the subunits of the membrane associated cholinergic receptor.* Mol Pharmacol 15:213-226.
- Wells GB, Anand R, Wang F, Lindstrom J. **1998.** *Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by alpha7 subunit extracellular domains.* J Biol Chem 273:964-973.
- West AP, Jr., Bjorkman PJ, Dougherty DA, Lester HA. **1997.** *Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor.* J Biol Chem 272:25468-25473.
- White BH, Cohen JB. **1992.** *Agonist-induced changes in the structure of the acetylcholine receptor M2 regions revealed by photoincorporation of an uncharged nicotinic noncompetitive antagonist.* J Biol Chem 267:15770-15783.
- Whittaker VP. **1998.** *Arcachon and cholinergic transmission.* J Physiol Paris 92:53-57.
- Williamson PT, Meier BH, Watts A. **2004.** *Structural and functional studies of the nicotinic acetylcholine receptor by solid-state NMR.* Eur Biophys J.
- Wilson G, Karlin A. **2001.** *Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method.* Proc Natl Acad Sci U S A 98:1241-1248.

- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J. **1997**. *Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria*. Science 277:60-66.
- Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. **2003**. *Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation*. Science 299:700-704.
- Yao Y, Wang J, Viroonchatapan N, Samson A, Chill J, Rothe E, Anglister J, Wang ZZ. **2002**. *Yeast expression and NMR analysis of the extracellular domain of muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit*. J Biol Chem 277:12613-12621.
- Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, Nikaido H, Koshland DE, Jr. **2003**. *Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump*. Science 300:976-980.
- Yushmanov VE, Xu Y, Tang P. **2003**. *NMR structure and dynamics of the second transmembrane domain of the neuronal acetylcholine receptor beta 2 subunit*. Biochemistry 42:13058-13065.
- Zacharias N, Dougherty DA. **2002**. *Cation-pi interactions in ligand recognition and catalysis*. Trends Pharmacol Sci 23:281-287.
- Zhang H, Karlin A. **1997**. *Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the beta-subunit*. Biochemistry 36:15856-15864.
- Zhang H, Karlin A. **1998**. *Contribution of the beta subunit M2 segment to the ion-conducting pathway of the acetylcholine receptor*. Biochemistry 37:7952-7964.
- Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA. **1998**. *From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A 95:12088-12093.
- Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P. **2001**. *Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 Å resolution*. Nature 409:739-743.
- Zwart R, van Kleef RG, Gotti C, Smulders CJ, Vijverberg HP. **2000**. *Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs*. J Neurochem 75:2492-2500.

Chapitre 3 :

Synthèse et Caractérisations d'AC5

I)	Principe du marquage de photoaffinité	63
II)	Nouvelle Synthèse de [³H]<u>AC5</u>	65
III)	Caractérisation photochimique d'<u>AC5</u>	67
IV)	La torpille comme source de nAChRs	68
V)	Caractérisation pharmacologique d'<u>AC5</u>	70
	A) Liaison d' <u>AC5</u> au site agoniste	70
	B) Liaison d' <u>AC5</u> au site canal	72
	C) Propriétés agonistes d' <u>AC5</u>	73
VI)	Conclusion	75
VII)	Partie expérimentale chimique	76
	A) Généralités	76
	B) Synthèse d' <u>AC5</u> non-radiomarké	77
	C) Synthèse du radioligand [³ H] <u>AC5</u>	86
VIII)	Partie expérimentale biochimique	91
	A) Généralités	91
	B) Préparation membranaire	91
	C) Dosage de sites [¹²⁵ I]α-BgTx	92
	D) Mesure d'hydrolyse d' <u>AC5</u> en préparation membranaire	93
	E) Expériences de compétition - mesure en vitesse initiale	93
	F) Expériences de compétition - mesure à l'équilibre	93
	G) Expériences de saturation	94

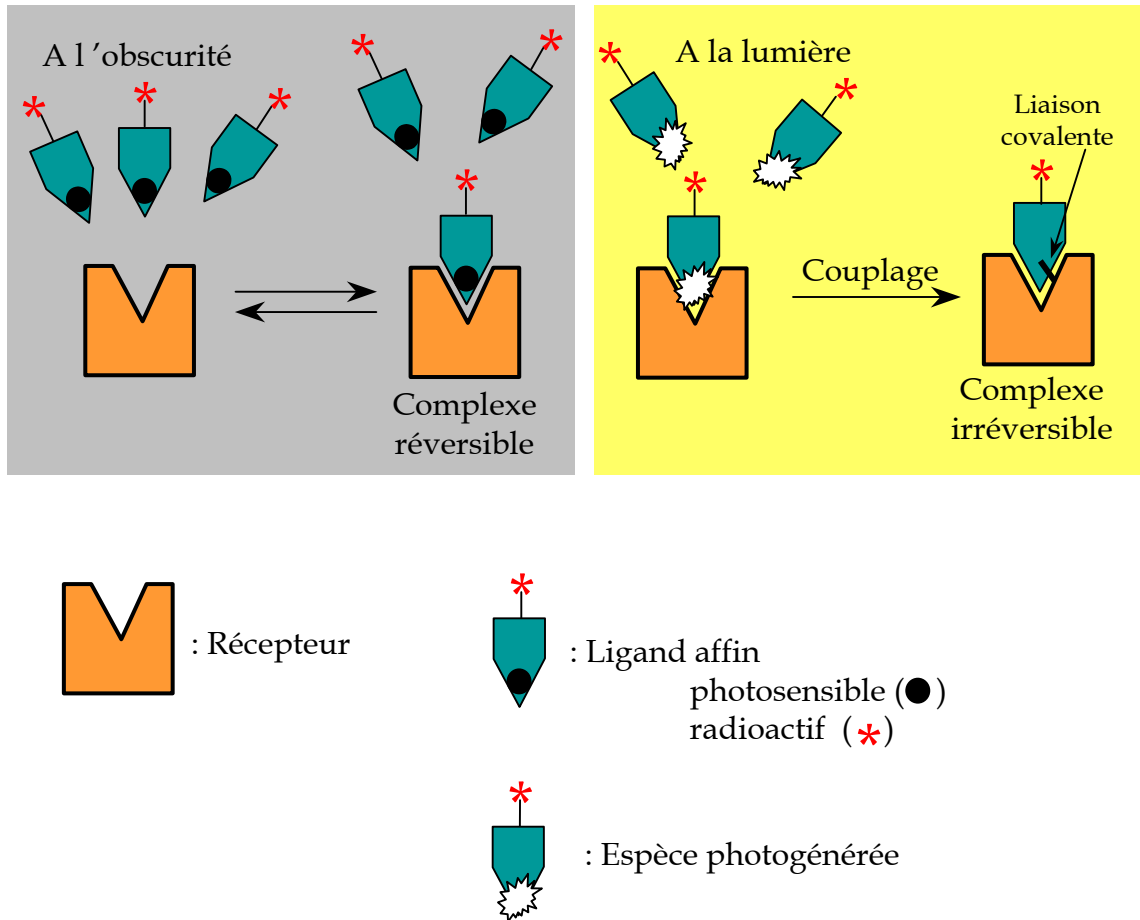


Figure 3-1. Principe du marquage de photoaffinité. A l'obscurité, il est possible de déterminer les propriétés pharmacologiques du ligand photosensible vis-à-vis du récepteur. En présence de lumière les sondes photosensibles sont excitées et l'espèce générée correspondante hautement réactive, s'incorpore dans le site avec formation d'une liaison covalente. Le complexe devient alors irréversible.

L'étude structurale et dynamique du nAChR que nous avons entreprise utilise une technique (le marquage de photoaffinité) et une molécule (AC5) développées au sein de notre laboratoire. Nous décrirons dans ce chapitre le principe de cette technique, les améliorations apportées à la synthèse d'AC5, ainsi que notre contribution à l'étude pharmacologique de cet agoniste nicotinique photosensible.

I) Principe du marquage de photoaffinité

Un des événements majeurs de la réponse biologique est la reconnaissance d'un ligand bio-actif par son récepteur. L'élucidation des partenaires de cette interaction est une étape indispensable à la découverte de nouveaux médicaments.

Une méthode d'investigation consiste à créer un lien covalent entre le récepteur et le ligand, afin d'identifier les acides aminés du récepteur impliqués dans le site de liaison des ligands. Ce lien peut être réalisé soit par la technique de marquage d'affinité, soit par la technique de marquage de photoaffinité.

Le marquage d'affinité est basé sur l'existence dans le site d'un résidu nucléophile capable de réagir avec une sonde électrophile. Pour des raisons de stabilité dans l'eau, l'électrophilie de cette sonde doit être modérée, mais suffisante pour relayer l'alkylation du site visé. Ce type de marquage ne permet cependant d'identifier qu'un ou deux résidus du site de liaison, et ce site doit contenir un acide aminé nucléophile, ce qui est courant chez les enzymes mais plus rare chez les récepteurs. Par ailleurs, la protéine doit être disponible en grande quantité afin d'analyser le marquage au niveau du résidu. Une alternative originale permettant de travailler à la fois sur des sites de liaison sans résidu nucléophile et sur des protéines disponibles en quantité limitée a été développée dans notre laboratoire (Foucaud et al., 2001). Elle consiste à introduire dans un récepteur des mutants cystéines réactifs à des endroits choisis (grâce à la préexistence de modèles du site) et de faire réagir dans ce site des ligands affins électrophiles. La liaison irréversible du ligand se traduit en général par une inactivation ou une activation constitutive du récepteur. L'obtention de trois points d'ancrage pour un ligand permet ensuite de tracer un pharmacophore fiable.

Le marquage de photoaffinité consiste à exacerber l'électrophilie de la sonde sous l'action de la lumière. La sonde utilisée doit donc posséder une fonction photosensible qui,

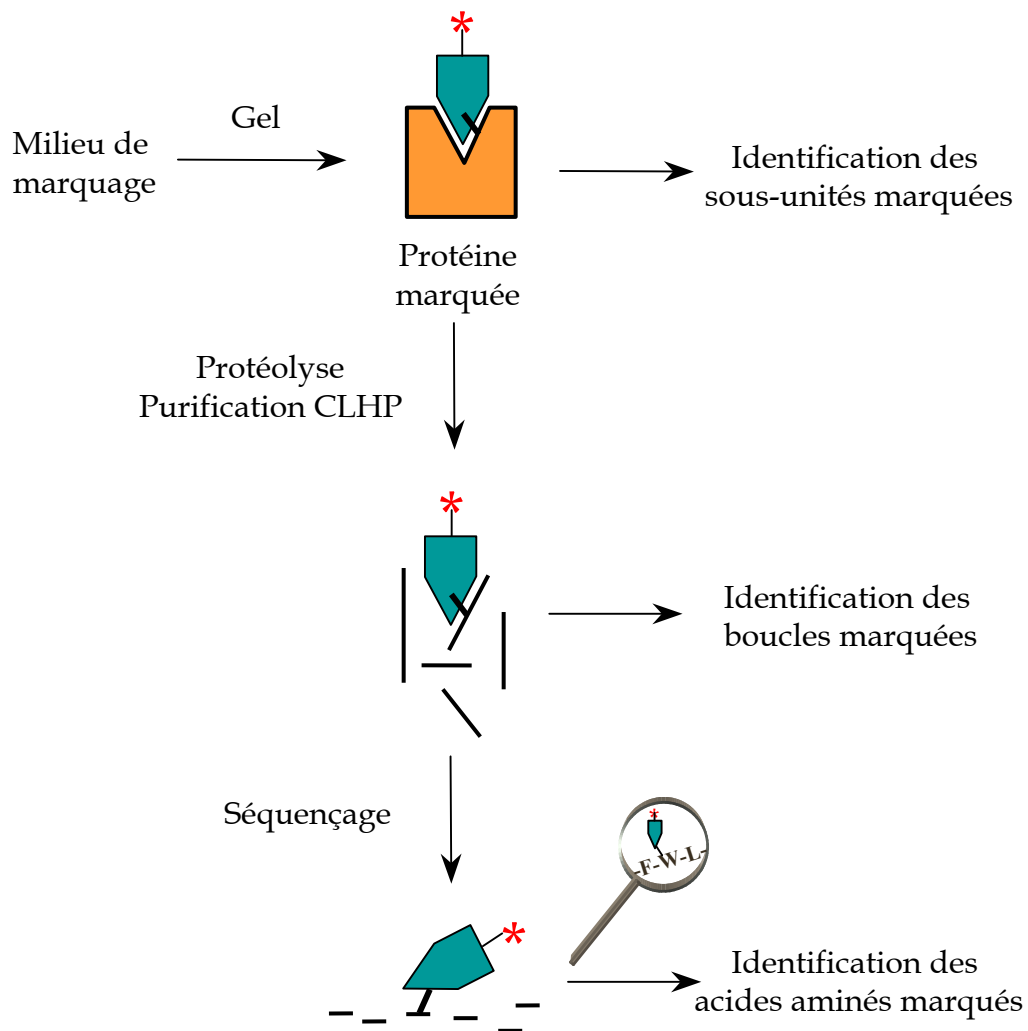


Figure 3-2. Analyse des protéines alkylées après marquage de photoaffinité. A l'issu du photomarquage, les protéines alkylées sont purifiées sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes afin d'identifier les sous-unités marquées. Les sous-unités marquées sont ensuite protéolysées et les peptides sont purifiés par CLHP afin d'identifier les peptides radioactifs. L'étape de séquençage permet d'identifier les résidus ayant incorporés la sonde radioactive.

après photoactivation, génère une entité hautement réactive capable de s'incorporer de façon covalente dans la protéine quels que soit les résidus présents dans le site (nucléophile ou non). Le marquage de photoaffinité permet donc véritablement de topographier les sites de liaison (pour revue voir (Kotzyba-Hibert et al., 1995)).

Le marquage de photoaffinité repose sur plusieurs principes (**Figure 3-1**) : (1) la sonde doit être stable à l'obscurité et en milieu tamponné. Il est effectivement important que la sonde ne réagisse pas avec les résidus du site en absence de lumière, auquel cas on a affaire à un marquage d'affinité. Par ailleurs, cette stabilité à l'obscurité permet de réaliser un complexe réversible entre la sonde et le récepteur, dont on peut mesurer l'affinité. (2) la lumière doit générer une entité hautement réactive (arylcation, radical...) qui va réagir extrêmement rapidement avec les molécules qui l'entourent (solvant, protéine...). La haute réactivité de l'espèce photogénérée permet de limiter le marquage non-spécifique mais également d'étudier la dynamique des protéines. (3) la sonde doit posséder préférentiellement des caractéristiques spectrales compatibles avec l'irradiation de protéines, c'est-à-dire classiquement $\lambda_{\text{max}} \geq 300 \text{ nm}$, afin de ne pas photodégrader les protéines. (4) la liaison covalente photogénérée doit être chimiquement stable afin de résister aux nombreuses étapes biochimiques successives nécessaires à l'identification des résidus marqués. Ces analyses (**Figure 3-2**) peuvent notamment se dérouler en milieu fortement dissociant (SDS-PAGE, dialyse...), fortement réducteur (réduction des cystéines) ou fortement hydrolytique (CLHP en milieu acide, séquençage...)

Le photomarquage a donc beaucoup été utilisé dans un but d'élucidation structurale de protéines, souvent membranaires, pour lesquelles une structure à haute résolution manquait. Dans quelques rares cas il a été aussi utilisé pour étudier la dynamique du site de ces protéines. Aujourd'hui, grâce à l'émergence de nouvelles technologies (chimie combinatoire, biologie moléculaire, spectrométrie de masse, criblage à haut débit...), le potentiel du photomarquage s'étend à l'analyse protéomique (Hatanaka & Sadakane, 2002).

Grâce à l'émergence d'un bon modèle structural dû à la résolution de la structure de l'AChBP (Brejc et al., 2001), l'étude que nous avons entreprise avec AC5 sort du cadre d'identification de résidus impliqués dans un site de liaison. Nous avons au cours de cette thèse utilisé le marquage de photoaffinité dans un but à la fois structural (orientation d'AC5 dans son site) mais aussi fonctionnel : notre objectif était d'essayer de comprendre au niveau moléculaire, et grâce à la structure de l'AChBP, les réorganisations structurales subies par le nAChR après exposition à un agoniste.

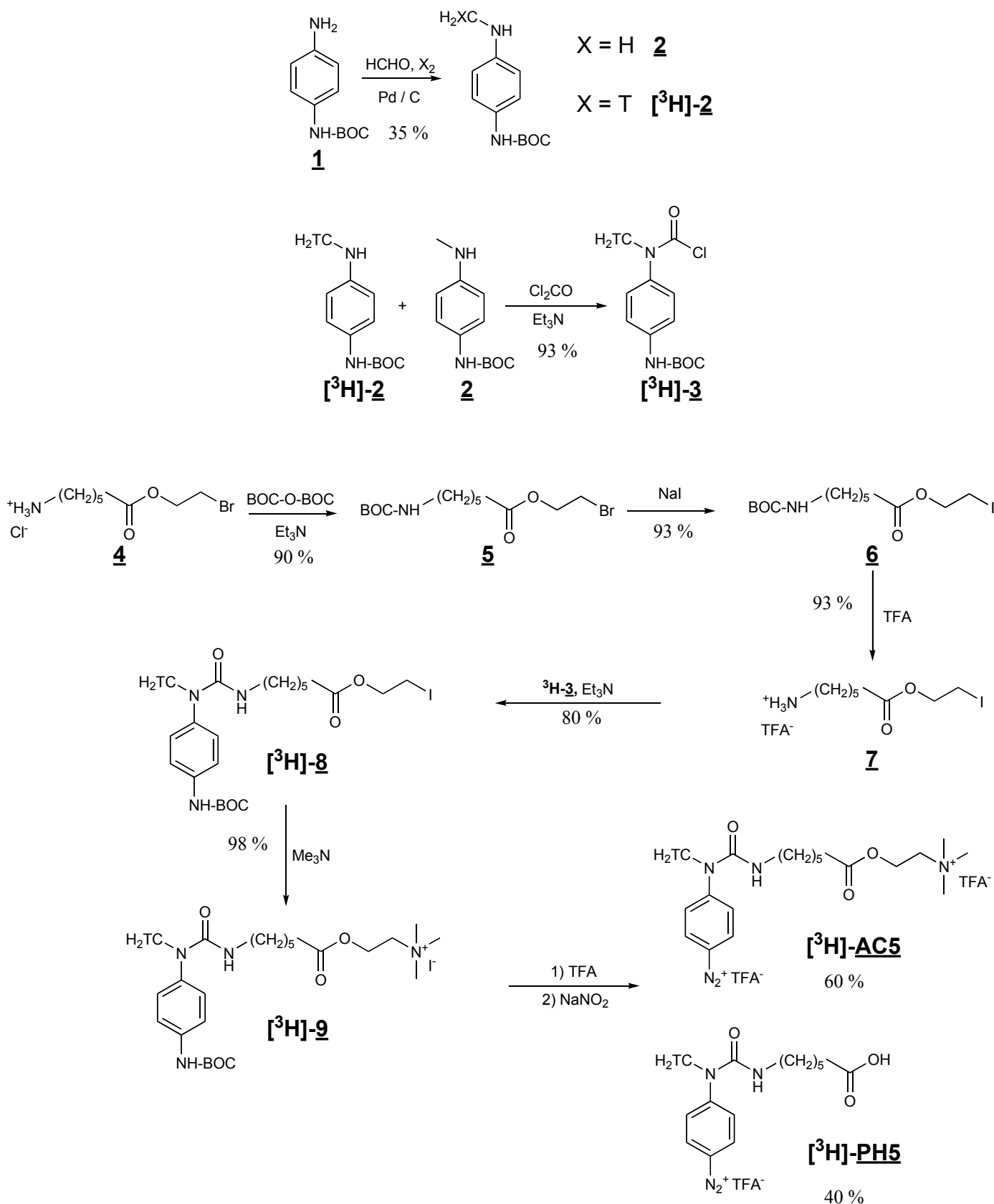


Figure 3-3: Schéma de synthèse de [³H]AC5. D'après (Mourot et al., 2002).

II) Nouvelle Synthèse de [³H]AC5

Une synthèse de [³H]AC5 avait déjà été décrite au laboratoire (Chatrenet et al., 1992). Cette synthèse, utilisant l'iodure de méthyl tritié comme précurseur radioactif, permettait d'incorporer trois atomes de tritium par molécule. Etant donné la non-disponibilité actuelle de ce précurseur radioactif, nous avons été amené à remettre au point la synthèse. Par ailleurs, étant donné que cette synthèse nécessitait quatre étapes, chacune suivie d'une purification CLHP, et que le rendement global n'excédait pas 10 %, nous avons essayé d'améliorer le protocole de synthèse. Une synthèse de la sonde non marquée a été nécessaire dans un premier temps pour optimiser la synthèse et pour pouvoir appliquer la méthodologie au composé radiomarké.

L'incorporation du tritium se fait par une étape d'aminométhylation réductrice à partir du tritium gaz (**Figure 3-3**) et conduit donc à l'incorporation d'un seul atome de tritium par molécule. La synthèse et la purification de [³H]2 ont été réalisées à Saclay par Eric Doris du Service de Marquage Moléculaire et de Chimie Bioorganique, CEA / Saclay. Etant donné d'une part la disponibilité en grande quantité du nAChR de torpille, et d'autre part la sensibilité à la radiolyse des molécules à forte activité spécifique, un seul atome de tritium par molécule ne nous pose aucun problème. Nous avons même préféré diluer isotopiquement notre précurseur radioactif [³H]2 avec environ six équivalents de molécule non marquée 2.

L'étape limitante au niveau des rendements était l'obtention de la molécule [³H]9 (**Figure 3-3**). Le protocole décrit préalablement consistait à substituer un brome par la triméthylamine. Nous avons pensé utiliser un iode à la place du brome pour deux raisons : d'une part l'iode est un meilleur groupe partant, et d'autre part les sels d'iodure de triméthylammonium ont une tendance à précipiter dans le toluène, contrairement aux sels de bromure de triméthylammonium (Alexandre Specht, communication personnelle). En saturant le toluène anhydre (fraîchement distillé) avec la triméthylamine, nous avons ainsi augmenté considérablement les rendements de la synthèse d'AC5 (82 % au lieu de 50 % maximum) et de la synthèse radioactive de [³H]AC5 (quantitatif). Le sel d'iodure de triméthylammonium 9 ou [³H]9 apparaît ainsi au cours de la réaction sous forme d'un précipité blanc. La stabilité chimique de ce produit nous permet de le stocker plusieurs mois au congélateur.

La synthèse du bras espaceur iodé 7 a été réalisée à partir du bras espaceur bromé 4, après protection et déprotection de l'amine primaire par un groupement terbutoxycarbonyl.

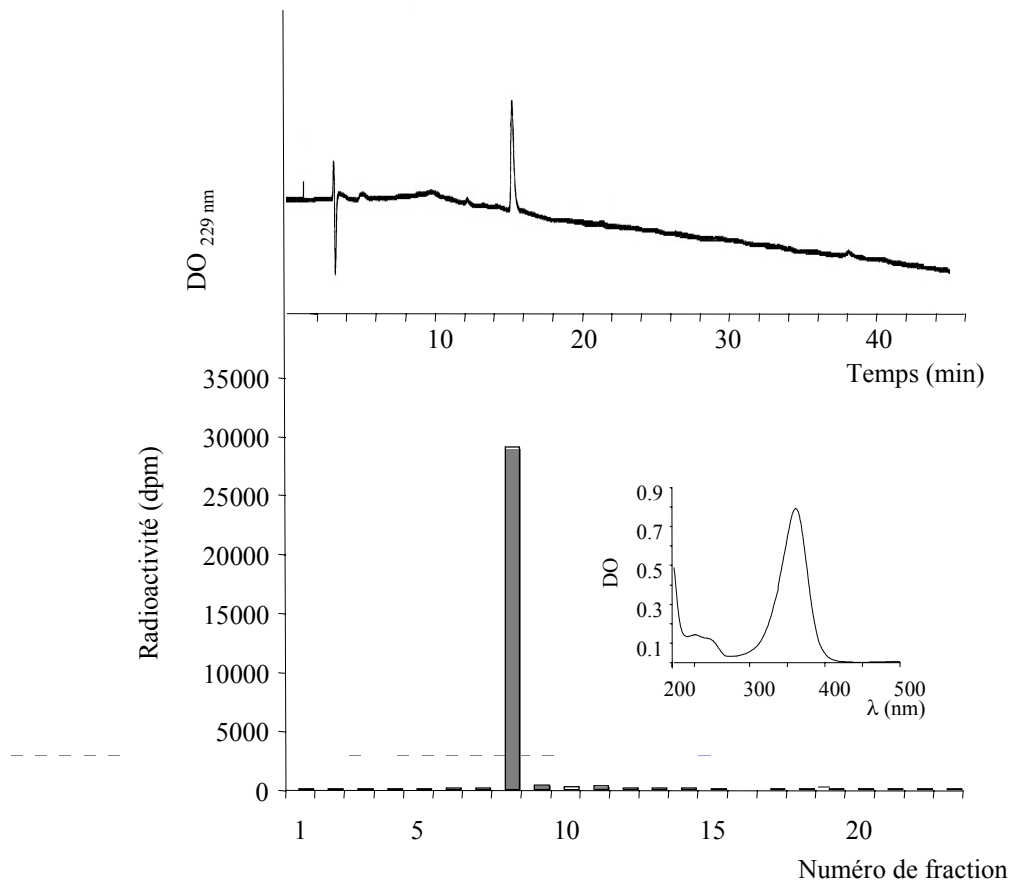


Figure 3-4: Analyse et purification CLHP de $[^3\text{H}]\text{AC5}$. 100 μl de $[^3\text{H}]\text{AC5}$ (38 μM dans l'eau) ont été injectés sur une colonne C18 et élués avec le gradient 1 (voir partie expérimentale). La purification est suivie par spectrophotométrie UV (229 nm, en haut) et par comptage de la radioactivité (aliquots de 10 μl , en bas). Le spectre UV de la fraction 8 est montré en encart. D'après (Mourot et al., 2002)

Les quatre étapes réalisées au laboratoire à partir du précurseur radioactif [^3H]2 ont des rendements quasi-quantitatifs et nous permettent ainsi de réaliser une seule étape finale de purification CLHP (**Figure 3-4**), minimisant de la même manière toute perte intempestive de molécule radioactive. Lors de la diazotation, il y a formation d'un produit secondaire qui correspond au produit d'hydrolyse de l'ester [^3H]PH5 (voir structure **Figure 3-3**). Ce produit secondaire a été identifié par spectrométrie de masse lors de la synthèse d'AC5.

Ce nouveau protocole permet donc d'obtenir [^3H]AC5 avec de bons rendements globaux. Les détails de cette synthèse sont décrits dans (Mourot et al., 2002).

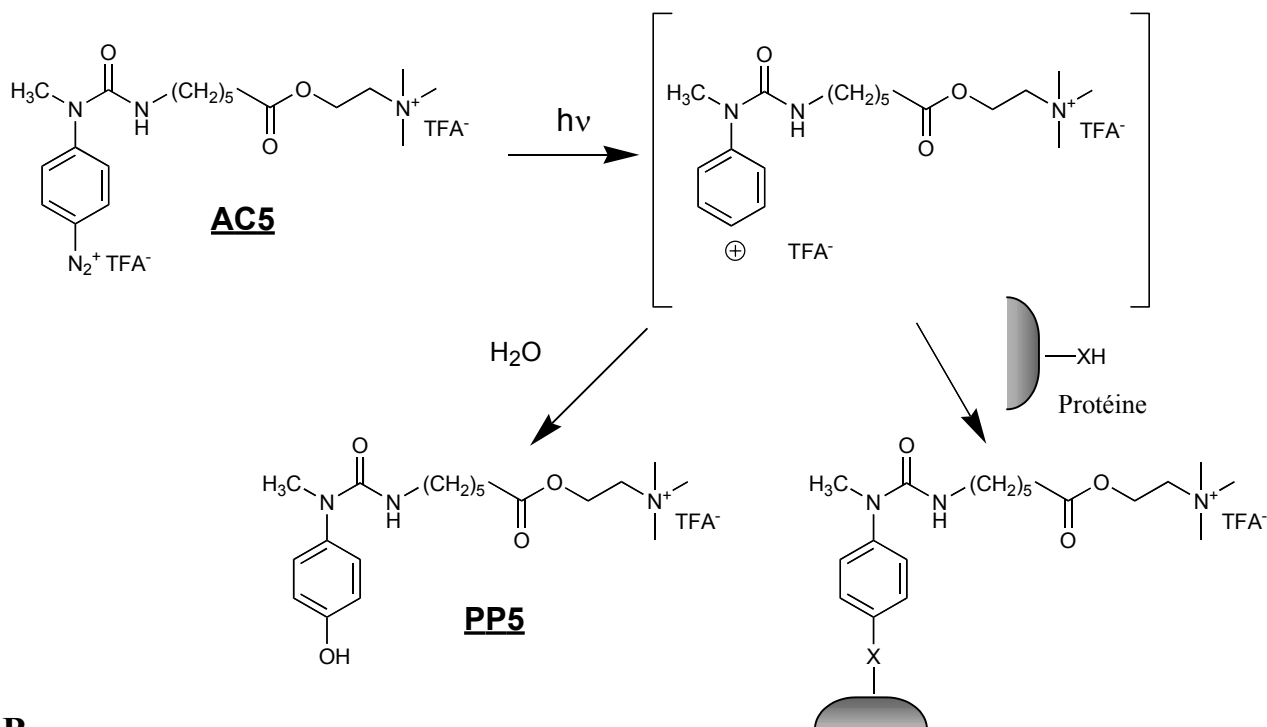
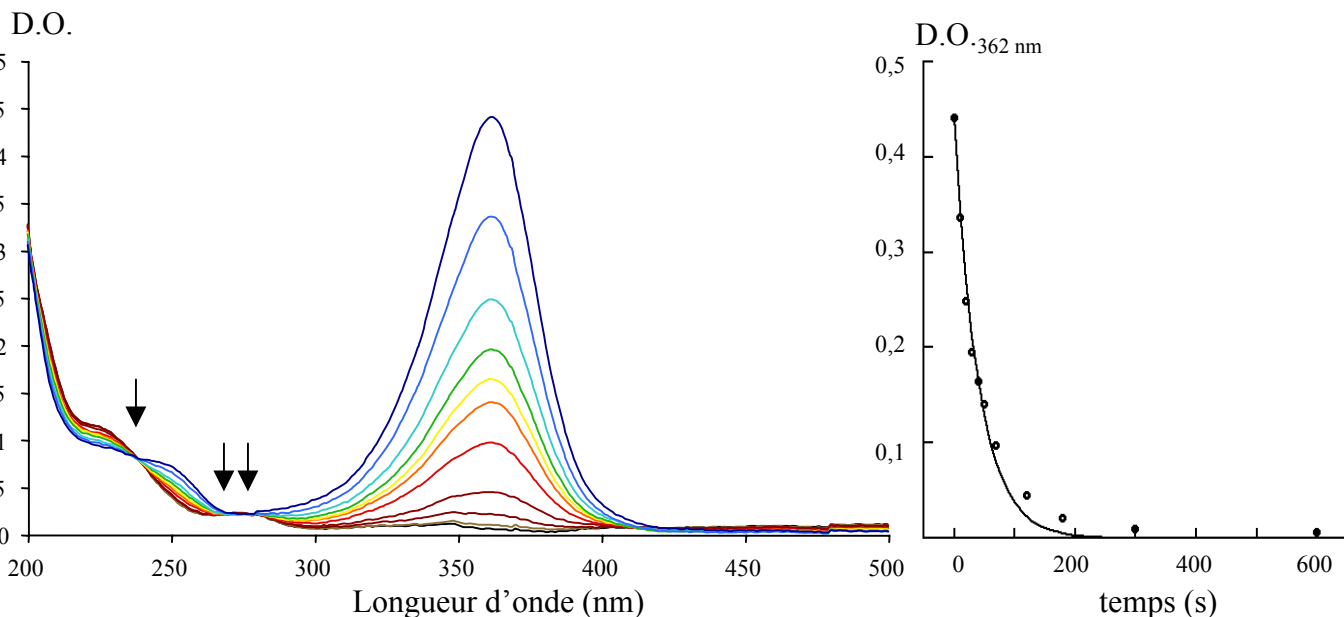
A**B**

Figure 3-5: Propriétés photochimiques d'AC5. (A) Sous l'action de la lumière, **AC5** forme un carbocation très instable qui va réagir extrêmement rapidement (< 500 ps) soit avec l'eau pour donner le produit de photolyse **PP5**, soit avec un atome X d'une protéine (CR_2 , hétéroatome). (B) Suivi spectrophotométrique de la photolyse d'AC5 (15 μM dans l'eau) irradié à 364,6 nm (énergie de la lampe incidente 70 μV). Caractéristiques spectrales d'AC5: $\lambda_{max} = 362$ nm, $\epsilon_{362} = 23\,400$ $M^{-1}cm^{-1}$. Durant la photolyse, l'absorbance initiale à 362 nm décroît et on note l'apparition de points isobestiques (238, 270 et 277 nm). Un temps de demi-vie de 28 s peut être calculé dans ces conditions expérimentales d'après l'équation de premier ordre: $DO_{(t)} = DO_{(0)}e(-k_{exp} \cdot t)$; $t_{1/2} = \ln 2 / k_{exp}$, avec k_{exp} la constante de vitesse apparente et $t_{1/2}$ le temps de demi-vie d'AC5. D'après (Mouro et al., 2002).

III)

Caractérisation photochimique d'AC5

La fonction photosensible d'AC5 est, comme pour le DDF, sa partie aryldiazonium. Cette fonction, généralement considérée comme très instable, est stabilisée dans notre cas par le groupement électrodonneur urée en *para*. De plus, de tels aryldiazoniums montrent un spectre d'absorption au delà de 300 nm ($\lambda_{\text{max}} = 362 \text{ nm}$, $\epsilon = 23\,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et un très bon rendement quantique, ce qui en fait d'excellents candidats pour le marquage de photoaffinité.

La première étape de photodécomposition d'AC5 est la formation d'un aryl cation (**Figure 3-5**). Cet arylcation peut être généré aussi thermiquement et, de manière inattendue, est visualisé lors de l'analyse d'AC5 et de PH5 en spectrométrie de masse électrospray (température lors de l'ionisation : 140°C). Cet arylcation, stabilisé transitoirement par la présence du groupement électrodonneur en *para*, va alors réagir très rapidement ($< 500 \text{ ps}$ dans l'eau) avec son voisinage et conduire à la formation de liaisons covalentes C-O, C-N ou même C-C (pour revue voir (Kotzyba-Hibert et al., 1995)). AC5 est donc également un bon candidat pour le photomarquage dynamique car le temps de demi-vie de l'espèce photogénérée ($< \mu\text{s}$) est bien inférieur au temps nécessaire à la caractérisation des états conformationnels accessibles par les techniques de mélange rapide (ms). Lors de l'irradiation d'AC5 dans l'eau, il y a formation du dérivé phénolique PP5, que l'on peut suivre par spectrophotométrie UV (**Figure 3-5**). La superposition des spectres enregistrés à différents temps nous montre la présence de points isobestiques, témoin d'une réaction photochimique univoque (AC5 $\rightarrow$ PP5).

AC5 est stable à l'obscurité et en milieu tamponné ($t_{1/2} > 2 \text{ jours}$ dans un tampon NaPi pH 7,2, Tris pH 7,2 ou Ringer (tampon utilisé pour l'électrophysiologie), données non montrées).

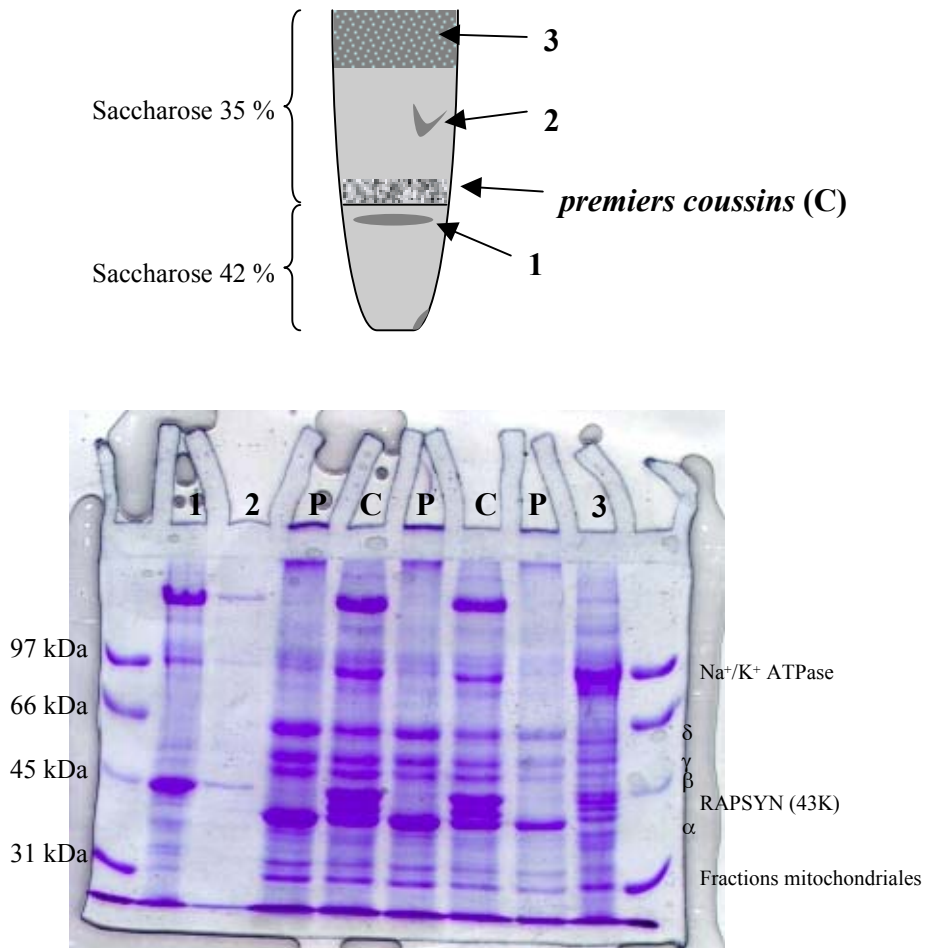


Figure 3-6: Préparation membranaire enrichie en nAChRs. Représentation des coussins de saccharose à l'issue de la centrifugation. Les différentes fractions membranaires séparées sur ces coussins sont ensuite analysées par SDS-PAGE 10%. Les *premiers coussins* (C) sont situés à l'interface des coussins de saccharose 35% et 42%. Ils contiennent environ 1 nmole de sites α -Bgtx / mg de protéine, soit une pureté d'environ 15%. En dessous de l'interface et au dessus des premiers coussins se trouvent deux fractions membranaires (1) et (2) riches en RAPSIN. En haut du tube se trouve une fraction riche en Na⁺/K⁺ ATPase (3). Un traitement alcalin des *premiers coussins* (C) permet d'enrichir cette fraction membranaire d'un facteur 3 à 4 fois en nAChR (P), soit une pureté finale de 45 à 60 % pour les *pH11*.

IV)

La torpille comme source de nAChRs

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le nAChR de torpille est disponible en très grande quantité, ce qui est une véritable aubaine pour entreprendre des études par marquage de photoaffinité qui sont très gourmandes en récepteur.

Des préparations membranaires enrichies en récepteur sont obtenues à partir d'organes électriques de torpille selon le protocole décrit dans la partie expérimentale de ce chapitre. A l'issue d'une centrifugation en coussins de saccharose, on récupère à l'interface des deux coussins une bande cotonneuse riche en récepteurs nicotiniques (**Figure 3-6**) : on appellera par la suite cette fraction membranaire « *premiers coussins* ». Classiquement cette fraction membranaire contient environ 1 nmole de sites α -BgTx / mg de protéine.

Un traitement alcalin (pH 11) de ces *premiers coussins* (Saitoh & Changeux, 1980) permet ensuite d'enrichir la préparation membranaire en nAChR, notamment en éliminant les protéines RAPSIN et Na^+/K^+ ATPase (**Figure 3-6**). On appellera par la suite cette fraction membranaire « *pH11* » (N.B.: ce nom fait référence au traitement alcalin subi par la préparation membranaire mais ne correspond pas au pH de la solution)

Etant donné l'homologie structurale entre AC5 et l'ACh d'une part, et la présence d'AChE dans les membranes d'organes électriques de torpille d'autre part, il nous a paru important de vérifier la stabilité d'AC5 en présence des fragments membranaires issus des *premiers coussins* et en *pH11*. Nous avons donc incubé AC5 avec ces deux préparations pendant un temps t , puis nous avons séparé les membranes d'AC5 par microcon 10 (centrifugation 15'). Le filtrat a ensuite été injecté sur CLHP pour analyses (voir partie expérimentale). Les temps indiqués en **Figure 3-7** sont les temps d'incubation entre les membranes et l'AC5 avant centrifugation. Etant donné que la centrifugation prend 15 minutes, la séparation du ligand et des membranes n'est pas immédiate mais cette expérience nous permet d'obtenir une idée, et non pas une valeur exacte, sur les cinétiques d'hydrolyse de l'AC5 en préparation membranaire. C'est la raison pour laquelle les résultats ne montrent pas de barre d'erreur. Par ailleurs, ces cinétiques vont être dépendantes de nombreux facteurs tels que les concentrations respectives en AC5 et en protéine, la qualité de la préparation membranaire ou la température.

On observe qu'en *premier coussin*, AC5 est rapidement hydrolysé en PH5 (complètement au bout de 15 minutes, **Figure 3-7**), même si l'on ajoute au milieu une forte

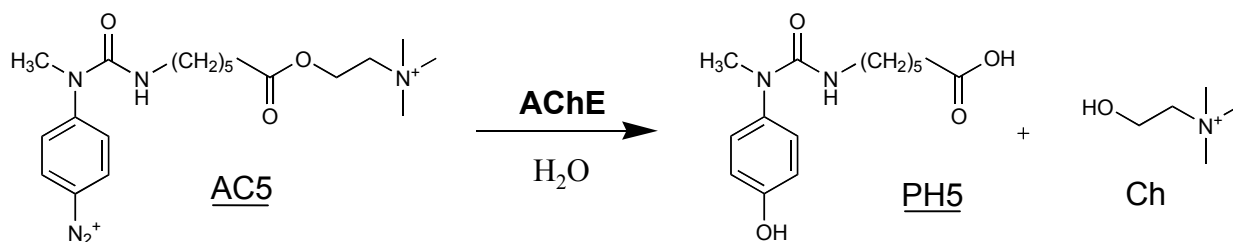
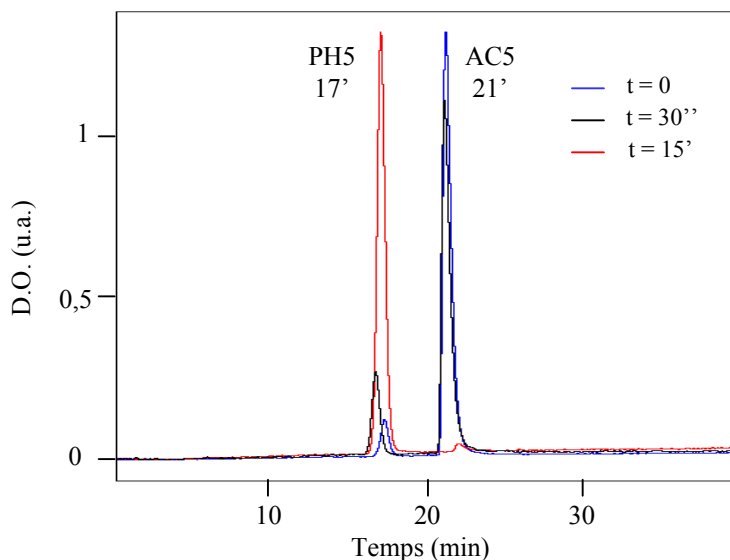
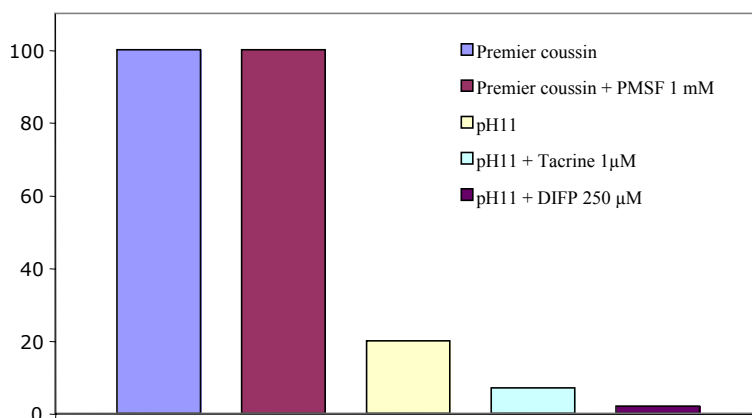
A**B****C**Hydrolyse d'AC5 (%) à $t = 30'$ 

Figure 3-7: Hydrolyse de la fonction ester d'AC5 par l'AChE. (A) L'hydrolyse d'AC5 conduit à la formation de PH5 et de choline. (B) Analyse CLHP de l'hydrolyse d'AC5 à différents temps d'incubation t . A $t = 0$, la solution d'AC5 contient déjà 3 % de PH5, issu de la synthèse chimique. Les temps de rétention d'AC5 et du PH5 sont indiqués. (C) Pourcentage d'hydrolyse d'AC5 au bout de trente minutes d'incubation avec les préparations membranaires *premier coussin* ou *pH11*. Des tentatives d'inhibition de l'hydrolyse ont été effectuées en préincubant les membranes trente minutes soit avec le PMSF 1 mM, soit avec la tacrine 1 μ M, soit avec le DIFP 250 μ M.

concentration d'inhibiteur d'estérase (une incubation de 30 minutes des *premiers coussins* avec 1 mM PMSF diminue la cinétique de décomposition d'AC5 d'un facteur 2 seulement). Il ne semble donc pas raisonnable d'étudier la pharmacologie d'AC5 sur le nAChR issus des *premiers coussins*.

En présence de membranes *pH11*, le temps de demi-vie d'AC5 est bien plus important puisqu'au bout de 30 minutes d'incubation il reste encore 80 % d'AC5. Afin de vérifier si cette disparition était bien due à l'activité de l'AChE, nous avons préincubé pendant 30 minutes la préparation membranaire *pH11* avec une concentration faible (1 μ M) d'inhibiteur spécifique de l'AChE (tacrine ou procaïnamide). Puis nous avons mesuré le pourcentage d'hydrolyse d'AC5 après 30 minutes d'incubation avec cette préparation membranaire. De manière intéressante, ces faibles concentrations en tacrine ou en procaïnamide protègent AC5 de l'hydrolyse, montrant ainsi que l'AChE est capable d'hydrolyser AC5. On pourrait ainsi imaginer utiliser AC5 comme outil d'étude fonctionnel des cholinestérases (substrat photosensible). Le traitement à pH 11 permet ainsi d'éliminer la plupart des cholinestérases présentes au niveau membranaire. Cependant, l'activité estérasique résiduelle n'est pas négligeable et nous avons besoin de l'inhiber. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, les inhibiteurs spécifiques d'AChE sont aussi souvent des modulateurs allostériques du nAChR. Par ailleurs, nous avons mesuré l'affinité de ces deux inhibiteurs d'AChE pour le site agoniste du nAChR ($K_p = 110 \mu\text{M}$ pour la tacrine, $K_p = 860 \mu\text{M}$ pour la procaïnamide, données non montrées). Il est donc impossible de mener des études fonctionnelles sur le nAChR avec ces inhibiteurs. Nous avons donc pensé utiliser le DIFP qui est un inhibiteur non sélectif des estérases. Le DIFP (250 μ M) incubé 30 minutes avec les membranes *pH11* nous permet d'avoir une hydrolyse minime (< 3%) d'AC5 après 30 minutes d'incubation avec ces membranes (**Figure 3-7**). Toutes les expériences ultérieures nécessitant l'incubation d'AC5 avec le nAChR se feront donc en préincubant les *pH11* 30 minutes minimum avec 250 μ M de DIFP.

V) Caractérisation pharmacologique d'AC5

Le nAChR possède, on l'a vu au chapitre précédent, deux sites pharmacologiques principaux : le site des agonistes et antagonistes compétitifs et le site des bloqueurs non-compétitifs du canal. La caractérisation pharmacologique d'AC5 passe donc par la détermination de son affinité pour ces deux sites et par mesure de son pouvoir agoniste et/ou antagoniste.

A) Liaison d'AC5 au site agoniste

- Expériences de compétition

La mesure de l'affinité d'un ligand non-marqué ne peut se faire que par compétition avec un ligand marqué (radioactivité, fluorescence...) spécifique du même site et dont on connaît la constante de dissociation K_d . Dans ce cas, on détermine une constante d'inhibition (K_i) en mesurant la capacité du ligand à inhiber la liaison du ligand marqué. Ceci se fait généralement à l'équilibre thermodynamique, où une concentration croissante de ligand non-marqué et une concentration fixe de ligand marqué sont co-incubés avec le récepteur jusqu'à l'obtention de l'équilibre. Le ligand libre est ensuite séparé du ligand lié par une méthode de séparation physique rapide telle que la filtration ou la centrifugation.

L'affinité d'un ligand non-marqué pour le site ACh du nAChR se fait généralement par compétition avec l' $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BgTx}$. Néanmoins, comme nous l'avons déjà évoqué au chapitre précédent, les toxines ont des vitesses d'association assez lentes ($k_{\text{on}} = 3\text{-}5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) et des vitesses de dissociation extrêmement faibles ($k_{\text{off}} = 3,5 \cdot 10^{-6} \text{ s}^{-1}$), ce qui leur confère une très haute affinité, spécificité et sélectivité ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}} = 11 \text{ pM}$ (Weber & Changeux, 1974)). La liaison des toxines curarisantes sur le récepteur nicotinique est donc qualifiée de quasi-irréversible. Il est par conséquent impossible qu'un ligand non-marqué autre qu'une toxine puisse chasser la toxine marquée de son site et on ne peut donc pas effectuer une expérience de compétition à l'équilibre thermodynamique.

Cependant il est possible de mesurer la capacité d'un ligand froid à diminuer la vitesse d'association de l' $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BgTx}$. En effet, si le ligand non-marqué occupe un certain nombre de sites ACh, le nombre de sites accessibles à la toxine est donc plus petit et sa vitesse d'association sera réduite. Etant donné que les vitesses d'association de la toxine sont

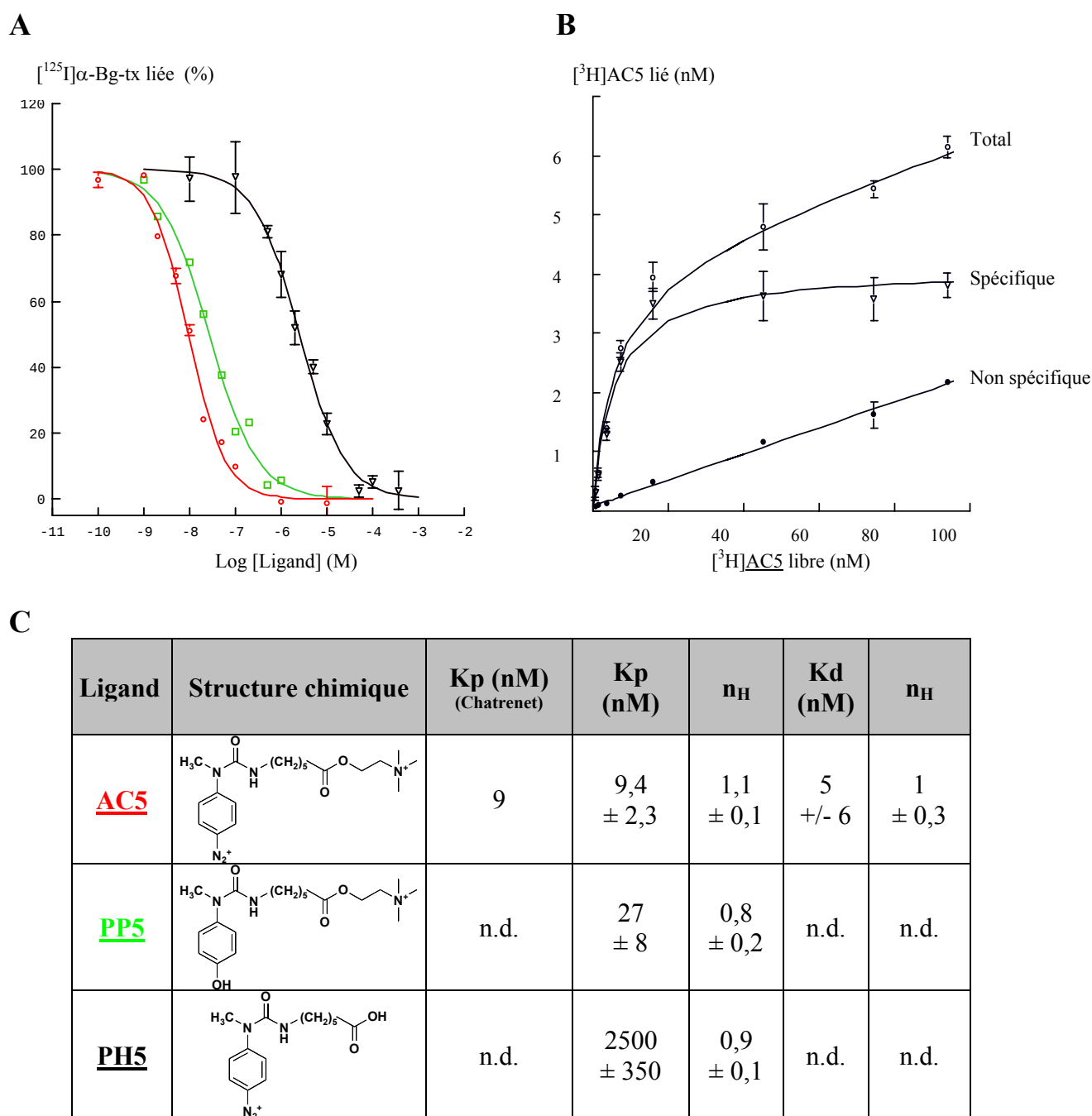


Figure 3-8 : Détermination de l'affinité d'AC5, de PP5 et de PH5 pour le site ACh. (A) Expériences de compétition avec l'α-Bg-tx iodée et détermination des constantes de protection Kp des trois composés en présence de proadifène (état D du récepteur nicotinique). Les barres d'erreur représentent les écarts-types de 2 à 3 expériences. **(B)** Expérience de saturation de sites ACh (4 nM) avec [³H]AC5 en présence de proadifène. Les barres d'erreur symbolisent les écarts-types de trois expériences. La liaison non-spécifique est déterminée en présence de 100 μM CCh. **(C)** Tableau récapitulatif des constantes de protection et des constantes de dissociation mesurées pour l'état D du nAChR au cours de cette thèse ainsi qu'au cours de la thèse de Benoît Chatrenet pour AC5 et ses dérivés. Les nombres de Hill (n_H) sont indiqués.

assez faibles, il est possible de visualiser ce phénomène de diminution de la vitesse avec les techniques classiques de binding. Nous pouvons ainsi mesurer une constante de protection K_p qui correspond à la concentration de ligand nécessaire à diminuer de moitié la vitesse initiale d'association de la toxine marquée (Weber & Changeux, 1974).

Nous avons ainsi mesuré le K_p d'AC5, de PP5 et de PH5 pour le récepteur sous l'état désensibilisé (données rassemblées dans le tableau de la **Figure 3-8**). L'état désensibilisé du nAChR est atteint en le préincubant 30 minutes minimum avec le proadifène qui est un bloquant non-compétitif du canal permettant de désensibiliser le nAChR de torpille à 75 % (Heidmann et al., 1983). L'affinité mesurée en présence de proadifène reflète donc l'affinité principalement (ou totalement) sous l'état D.

L'affinité mesurée pour AC5 (9 nM) est en parfait accord avec les résultats précédents (Chatrenet et al., 1992). C'est un ligand de haute affinité pour le site ACh, du même ordre de grandeur que l'ACh ($K_p = 10$ nM selon (Weber & Changeux, 1974), mesurée dans nos conditions à 20 nM, données non montrées) et que la Dns-C₆-Ch ($K_p = 10$ nM, (Heidmann & Changeux, 1979)).

L'affinité mesurée pour le produit de photolyse PP5 est assez proche de celle d'AC5 et de celle de l'ACh. L'affinité mesurée du produit d'hydrolyse PH5 est par contre environ 300 fois plus faible (**Figure 3-8**). L'ensemble de ces résultats montre l'importance de la partie cholinomimétique dans la reconnaissance de ces ligands par le site ACh. Le groupement aryldiazonium semble par contre jouer un rôle minime dans cette interaction.

Par ailleurs, les nombres de Hill proches de 1 pour ces trois molécules (**Figure 3-8C**) nous permettent de penser que le nAChR est bien dans un état désensibilisé puisqu'aucune coopérativité de liaison n'est observée.

- Expériences de saturation

Disposant de la sonde AC5 radiomarquée, il nous est possible de mesurer directement l'affinité de cette molécule pour les sites ACh. Le principe repose sur l'incubation, à l'obscurité et à l'équilibre, de concentrations croissantes de [³H]AC5 avec les membranes *pH11*. Le milieu réactionnel est filtré afin de retenir les complexes récepteur – ligand. Les filtres sont présaturés en charges positives à l'aide du PEI (polyéthylèneimine), ce qui permet de diminuer grandement le bruit de fond en évitant l'adsorption non spécifique d'AC5 (dichargé positivement) sur les filtres de fibre de verre. Nous avons vérifié qu'en absence de membranes, la liaison de [³H]AC5 aux filtres est négligeable, et que, de ce fait, la

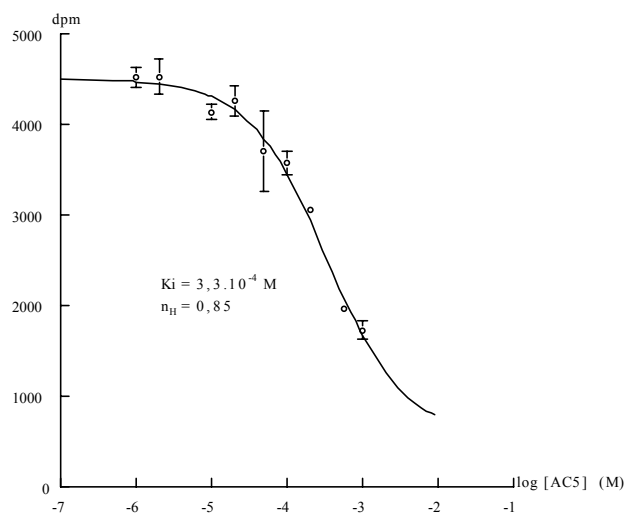


Figure 3-9: Expérience de compétition à l'équilibre entre $[^3\text{H}]\text{PCP}$ et AC5 en présence de CCh.

préparation membranaire possède des sites de liaison spécifiques d'AC5. Par ailleurs, cette liaison réversible de [³H]AC5 est protégeable par différents ligands cholinergiques (CCh et dTC) indiquant que cette liaison est spécifique des sites ACh du nAChR de torpille.

L'affinité est mesurée sur le nAChR désensibilisé par 15 μ M de proadifène. Le proadifène nous permet de désensibiliser le nAChR mais également dans ce cas de protéger le site BNC bien que, comme nous allons le voir par la suite, l'affinité d'AC5 pour ce site canal soit très faible. La constante de dissociation mesurée ($K_d = 5$ nM, voir **Figure 3-8**) est très proche de la constante de protection K_p mesurée pour AC5 non-marqué ($K_p = 9$ nM). Il y a donc une bonne corrélation entre ces deux valeurs. Par ailleurs, cette valeur est également proche de celles mesurées pour la [³H]ACh ($K_d = 7$ nM, (Neubig & Cohen, 1979)) et par fluorescence pour la Dns-C₆-Ch ($K_d = 3$ nM pour le site $\alpha\delta$, $K_d = 9$ nM pour le site $\alpha\gamma$ (Song et al., 2003)).

Cette courbe de saturation nous permet de mesurer aussi le nombre de Hill ($n_H = 1$), permettant d'émettre l'hypothèse selon laquelle AC5 se lie avec la même affinité sur les deux sites. Cependant, la sensibilité de notre mesure ne nous permet pas d'exclure une différence d'affinité minime entre les deux sites, telle celle observée pour la Dns-C₆-Ch.

B) Liaison d'AC5 au site canal

La liaison d'AC5 au site BNC peut être mesurée par compétition à l'équilibre et au noir avec un bloquant du canal radiomarké : la [³H]PCP (voir structure **Figure 2-8**). Dans ces conditions on détermine la concentration d'AC5 capable de déplacer 50 % de la liaison spécifique de [³H]PCP (IC_{50}). Les expériences ont été réalisées en présence de CCh afin, d'une part, de protéger les sites ACh d'AC5 et, d'autre part, de désensibiliser le nAChR et d'augmenter ainsi l'affinité apparente d'AC5 pour ce site.

Dans ces conditions on a mesuré une IC_{50} de 330 μ M (**Figure 3-9**). Cette affinité est assez proche de celles déterminées auparavant soit sous l'état D (130 μ M), soit en occupant les sites avec l' α -BgTx, donc sur un récepteur à priori sous l'état R (500 μ M, (Chatrenet et al., 1992)).

D'autres agonistes à caractère hydrophobe tels la Dns-C₆-Ch (Heidmann & Changeux, 1979), la benzoylbenzoylcholine (Bartels, 1965) ou le décaméthonium (Adams & Sakmann, 1978) montrent aussi un caractère mixte agoniste / BNC (structures **Figure 2-6**).

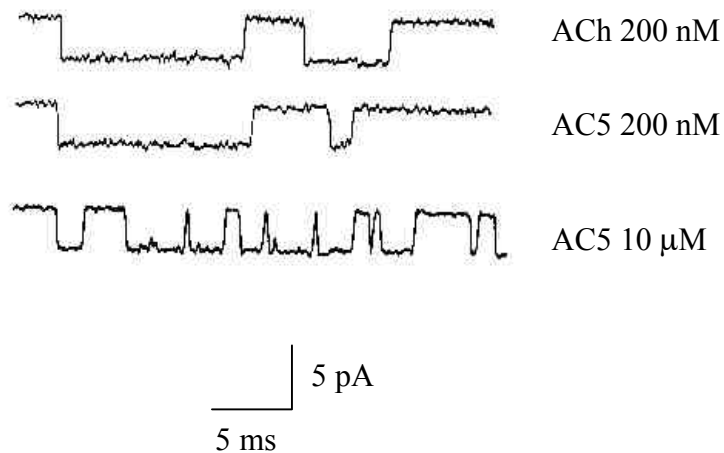


Figure 3-10: Mesures de courant sur canaux uniques activés par l'ACh ou AC5. Ces courants sont enregistrés en mode cellule attachée, sur des myotubes de muscle de souris de lignée Sol8. Le potentiel de pipette est maintenu à +50 mV, générant un potentiel transmembranaire de - 110 mV. D'après (Chatrenet et al., 1992).

C) Propriétés agonistes d'AC5

Les propriétés agonistes d'AC5 ont été montrées dans un premier temps par mesure de courants sur canaux uniques, enregistrés en mode cellule attachée sur des myotubes de muscles de souris (lignée cellulaire Sol8). De faibles concentrations d'AC5 (200 nM) sont capables d'induire des courants comparables à ceux générés par la même concentration en ACh. Par contre, dès 10 μ M, des interruptions brèves de courant montrent que AC5 se lie aussi au site BNC et inhibe le canal de manière stérique (voir **Figure 3-10** et (Chatrenet et al., 1992)).

Des mesures de flux d'ions générés par l'application de l'agoniste fluorescent Dns-C₆-Ch sur des microsacs contenant les nAChRs de torpille ont aussi montré qu'au delà de 10 μ M, on a une diminution du flux, avec une IC₅₀ de 30 μ M, qui correspond à la liaison de cet agoniste dans le site BNC (Heidmann & Changeux, 1979).

Il est important de noter que la longueur du bras espaceur entre la partie acétylcholine et la partie dansyl ou diazonium est très importante pour conserver un caractère agoniste. Alors qu'un espaceur en C₁ ou C₂ génère un antagoniste fluorescent compétitif du nAChR, un espaceur en C₃, C₄ ou C₅ conduit à un agoniste fluorescent, celui en C₅ étant le plus efficace (Waksman et al., 1976). Un espaceur plus long peut ensuite conduire à une diminution du rapport d'affinité entre site ACh et site BNC, et donc à un agoniste moins efficace (Chatrenet et al., 1992). La taille du groupement en bout de chaîne semble également déterminante pour conserver un caractère agoniste puisque l'insertion d'un fluorophore plus volumineux que la dansyl conduit irrémédiablement à un antagoniste compétitif (Maurice Goeldner, communication personnelle).

Il est cependant nécessaire de mesurer le caractère agoniste d'AC5 sur le sous-type de nAChR que nous utiliserons pour les expériences de photomarquage (*Torpedo marmorata*). Ce sous-type n'étant pas cloné, nous avons choisi d'utiliser le nAChR de l'espèce très proche *Torpedo californica*. Les vecteurs contenant les ADNc codant pour les sous-unités α , β , γ et δ nous ont été gracieusement donné par Deirdre Sullivan de l'équipe de Jonathan B. Cohen. Les sous-unités α , γ et δ sont dans un vecteur pMXT (un vecteur d'expression pour les oocytes) et la sous-unité β est dans un vecteur PSP64 (un vecteur procaryote). Les expériences d'électrophysiologie sont réalisées sur oocytes chez Daniel Bertrand à Genève. La technique employée est d'injecter directement les ADNc dans le noyau des oocytes ; il est donc nécessaire que les ADNc soient contenus dans des vecteurs d'expression eucaryotes. L'ADNc codant pour la sous-unité β étant dans un vecteur

procaryote, il est nécessaire de le sous-cloner dans le vecteur pMXT. Ce travail est actuellement en cours.

VI)

Conclusion

Nous avons optimisé les conditions de synthèse de [³H]AC5, en améliorant notamment les temps et les rendements de synthèse. Nous pouvons ainsi renouveler aisément notre stock de [³H]AC5 à la demande.

Cette sonde montre une très bonne affinité (10^{-8} M) pour le site agoniste sous l'état D, du même ordre de grandeur que son « cousin » fluorescent Dns-C₆-Ch. La sélectivité pour ce site par rapport au site canal est également importante (4 ordres de grandeur).

Bien que le caractère agoniste de cette sonde n'ait pas encore été démontré sur le nAChR de torpille, le fait qu'il soit un agoniste du nAChR musculaire de souris et que la Dns-C₆-Ch soit un agoniste partiel du nAChR de torpille sont deux arguments qui laissent espérer que AC5 soit aussi un agoniste (sûrement partiel, du fait notamment de son caractère mixte agoniste/BNC) du nAChR de torpille.

Etant donné que l'homologue structural Dns-C₆-Ch montre des intensités de fluorescence très dépendantes de l'état du récepteur, il est fort probable que les caractéristiques physico-chimiques de l'environnement de la dansyl évoluent au cours du temps. Ce groupement fluorescent semble donc être situé dans une région du récepteur nicotinique qui subit de véritables réorganisations structurales. L'analogie structurale entre la Dns-C₆-Ch et AC5 étant conséquente, le groupement aryldiazonium d'AC5 doit nous permettre de suivre la dynamique structurale du nAChR.

AC5 est donc une sonde idéale pour étudier les réorganisations structurales du nAChR de torpille qui suivent son activation. De plus, étant donné que le groupement aryldiazonium ne crée pas d'interaction spécifique avec le récepteur (au moins sous l'état D), cette fonction photosensible doit nous permettre véritablement de sonder et topographier l'environnement du site ACh au cours de la désensibilisation du récepteur.

VII)

Partie expérimentale chimique

A) Généralités

Réactions : Toutes les synthèses, sauf indication contraire, sont effectuées sous atmosphère inerte (Argon).

Distillation et séchage des solvants : Le THF est distillé sur sodium en présence de benzophénone comme indicateur coloré. L'éther et le dichlorométhane sont distillés sur NaH. L'acétone est distillé sur CaSO₄. Le toluène est séché sur sodium filé. L'éthanol et le méthanol sont séchés sur tamis moléculaire.

Produits photosensibles : Les ballons contenant des produits photosensibles sont enveloppés de papier aluminium. Les vitres des hottes sont opacifiées. Le traitement et la purification des produits fortement photosensibles sont effectués dans une chambre noire, faiblement éclairée avec une lampe jaune au sodium de marque Osram (Modèle Vialox NAV-E 70 W/E SON-E).

RMN : Les spectres ¹H et ¹³C des composés non radiomarqués sont enregistrés dans CDCl₃, CD₃OD, DMSO D₆ ou D₂O à 200 ou 300 MHz, sur un instrument Bruker VPC 200 ou 300 respectivement.

Spectrométrie de masse : Les spectres de masse des composés non radiomarqués sont effectués sur un appareil Mariner ESI-tof de Applied Bio-System / Perkin Elmer.

CLHP : Les analyses des composés non radiomarqués sont effectuées sur une colonne phase inverse C18 10μ-Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm. Les purifications des composés non radiomarqués sont effectuées sur une colonne phase inverse C18 10 μ-X-Tera Waters 250 X 10 mm. Le système CLHP est contrôlé par un Waters W600 Controller. Le système de détection est un Waters W2996 Photodiode Array Detector.

Les analyses des composés radiomarqués sont effectuées sur une colonne phase inverse C18 10 μ-Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm pilotée par un système Waters W510 Controller. Le système de détection est un Waters W441 Absorbance Detector.

Solvant A : H₂O/TFA 0,1%

Solvant B : ACN

Gradient 1 : 0 – 60 % solvant B en 40 min

60 – 100 % solvant B en 5 min

débit : 1,5 ml/min

Gradient 2 : isocratique 95 % solvant A ; 5 % solvant B

débit 1,5 ml/min (analytique) ou 4 ml/min (préparatif)

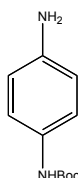
Spectrophotométrie UV-visible : les mesures d'absorption UV-visible sont effectuées sur un spectromètre Uvikon XL BIO-TEK.

Mesures de radioactivité : les comptages de tritium sont réalisés en diluant les échantillons plus de 10 fois dans du liquide de scintillant Emulsifier-Safe (Packard) et au moyen d'un compteur β à scintillation Tri-Carb 2100TR (Packard).

Irradiation : le système d'irradiation (Müller) est composé d'une lampe Xe/Hg de 1000 Watts (Hanovia) reliée à un monochromateur (Jobin-Yvon). Les fentes du monochromateur déterminent la surface irradiée. Un diaphragme placé entre la source et le monochromateur, permet de moduler l'intensité du faisceau lumineux. Celle-ci est mesurée à l'aide d'une thermopile (Kipp and Zohnen) couplée à un microvoltmètre (AOIP).

B) Synthèse d'AC5 non-radiomarké

N-terbutoxycarbonyl-para-phenylènediamine **1**.



$C_{11}H_{16}N_2O_2$

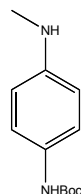
208,26 g/mol

(Goeldner et al., 1983)

Ce produit était en stock au laboratoire. Le contrôle de sa pureté a été effectué par RMN et CCM.

RMN- 1H ($CDCl_3$) : δ = 1,50 (s, 9H, 3 CH_3) ; 6,30 (br. s, 1H, NH) ; 6,59 - 6,63 (d, 2H, J = 8,8 Hz, 2 CH) ; 7,11 - 7,15 (d, 2H, J = 8,4 Hz, 2 CH).

N-méthyl-N'-terbutoxycarbonyl-para-phénylènediamine 2.



$C_{12}H_{18}N_2O_2$

222,28 g/mol

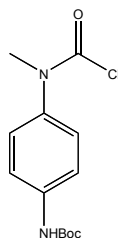
(Kessler et al., 1990)

1 g de **1** (4,85 mmol) est dissous dans 20 ml d'acétate d'éthyle. On fait alors buller de l'argon pendant 10 min dans le mélange réactionnel avant d'ajouter 100 mg de catalyseur Pd/C, puis on remplace le ballon d'argon par un ballon d'H₂. On ajoute alors 0,66 ml (5,1 mmol, 1,05 éq.) de formaldéhyde 37% dans H₂O à l'aide d'une seringue. On laisse sous agitation pendant 36 h. Après filtration sur célite (élimination du catalyseur) et évaporation du solvant, le brut réactionnel est chromatographié sur silice (AcOEt / hexane 4/6). On récupère 0,44 g d'huile jaune qui cristallise lentement.

Rendement : 35 %.

RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,50 (s, 9H, 3 CH₃) ; 2,82 (s, 3H, CH₃) ; 6,22 (br. s, 1H, NH) ; 6,56 - 6,60 (d, 2H, J = 8,8 Hz, 2 CH) ; 7,15 - 7,18 (d, 2H, J = 8,4 Hz, 2 CH).

N-méthyl-N-chloroformyl-N'-terbutoxycarbonyl-para-phénylènediamine 3.



$C_{13}H_{17}ClN_2O_3$

284,74 g/mol

(Kessler et al., 1990)

Précautions : Le phosgène est un gaz de combat très dangereux ($T_{éb} = 8,2^{\circ}C$), et il convient de prendre les précautions nécessaires. Le montage doit comprendre un ballon tricol

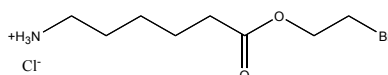
surmonté d'un ballon d'argon, d'une ampoule à addition et d'un réfrigérant. Le réfrigérant est relié à deux fioles de garde contenant environ 200 ml de NaOH 10 %. En sortie du deuxième piège, on place un tuyau que l'on accroche haut sous la hotte. En fin de réaction, tout le matériel est plongé durant une nuit dans une solution de soude 10 %.

920 mg (4,14 mmol) de **2** sont dissous dans 40 ml de toluène anhydre contenant 1 ml (7,2 mmol, 1,7 éq.) de triéthylamine. Ce mélange est ajouté, à l'aide de l'ampoule à addition, goutte-à-goutte à froid (4°C) à 10,9 ml (20,7 mmol, 5 éq.) de phosgène 20 % dans toluène. Une fumée blanchâtre se forme. Après addition, le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à 30°C. On chauffe alors à 50°C en agitant vigoureusement pour enlever le COCl₂ résiduel pendant 30 min. La phase organique est alors lavée trois fois à l'eau, en testant le pH à chaque fois à l'aide d'un papier pH. On lave ensuite une fois avec une solution aqueuse saturée en NaCl. Le pH mesuré est alors de 7-8, il ne reste donc théoriquement plus de phosgène en phase organique. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄, filtrée, évaporée puis séchée sous vide. Après recristallisation dans un mélange AcOEt / hexane, on obtient 950 mg de cristaux blancs.

Rendement : 80 %

RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,50 (s, 9H, 3 CH₃) ; 3,34 (s, 3H, CH₃) ; 6,58 (br. s, 1H, NH) ; 7,15 - 7,18 (d, 2H, J = 8,7 Hz, 2 CH) ; 7,41 - 7,44 (d, 2H, J = 8,7 Hz, 2 CH).

Chlorure de [6-amino-hexanoate de (2-bromo)-éthyle] **4**.



C₈H₁₇ClBrNO₂

274,58 g/mol

(Chatrenet, 1990)

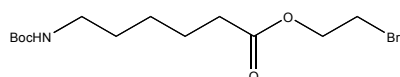
3 g (22,9 mmol) de l'acide 6-amino hexanoïque sont dissous (partiellement car pas très soluble) dans 15 ml de 2-bromoéthanol fraîchement distillé. On ajoute, goutte-à-goutte et à 0°C, 1,8 ml (40,5 mmol, 1,75 éq.) de chlorure de thionyl. Après agitation pendant une heure à 0°C, on chauffe à 60°C pendant 1 h. On évapore le solvant, on reprend dans le méthanol, et on cristallise dans l'éther éthylique. Les cristaux sont filtrés et lavés à l'éther. On obtient 5,83 g de poudre blanche.

Rendement : 92 %

RMN-¹H (CD₃OD) : δ = 1,40 - 1,51 (m, 2H, CH₂) ; 1,62 - 1,77 (m, 4H, 2 CH₂) ; 2,38 - 2,46 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 2,90 - 2,97 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 3,57 - 3,63 (t, 2H, J = 5,7 Hz, CH₂) ; 4,36 - 4,42 (t, 2H, J = 5,7 Hz, CH₂).

RMN ¹³C (CD₃OD) : δ = 24,6 ; 26,2 ; 31,2 ; 32,7 ; 34,1 ; 40,4 ; 63,7 et 174,7.

[6-(terbutoxycarbonyl)-amino]-hexanoate de (2-bromo)-éthyle 5.



C₁₃H₂₄BrNO₄

338,24 g/mol

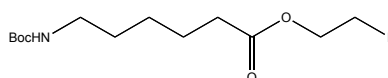
(Mourots et al., 2002)

2 ml (8,7 mmol, 1,2 équivalents) de di-*tert*-butyl-dicarbonat et 1,12 ml (8 mmol, 1 éq.) de triéthylamine sont ajoutés à une solution de **4** (2 g, 7.3 mmol) dans 20 ml d'éthanol. On laisse sous agitation à température ambiante pendant 5 h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans 150 ml de CH₂Cl₂ et la phase organique est lavée à l'eau et séchée (Na₂SO₄). L'huile obtenue est purifiée sur colonne de silice (pentane / éther: 8/2) et l'on obtient 2,2 g (6,6 mmol) d'huile jaune.

Rendement : 90%.

RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,26 - 1,70 (m, 15H, 3 CH₂, 3CH₃) ; 2,27 - 2,35 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 3,01 - 3,12 (pseudo-q, 2H, J = 6,6 Hz, CH₂) ; 3,43 - 3,50 (t, 2H, J = 6,1 Hz, CH₂) ; 4,30 - 4,37 (t, 2H, J = 6,1 Hz, CH₂) ; 4,60 (br s, 1H, NH).

[6-(terbutoxycarbonyl)-amino]-hexanoate de (2-iodo)-éthyle 6.



C₁₃H₂₄INO₄

385,24 g/mol

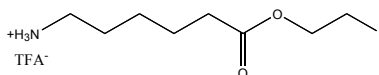
(Mourots et al., 2002)

À une solution de **5** (1,43 g, 4,2 mmol) dans 20 ml d'acétone fraîchement distillé sont ajoutés 5,2 g (34,6 mmol, 8,2 éq.) de NaI anhydre. Le mélange est chauffé à reflux pendant 45h. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans 150 ml de CH₂Cl₂ et lavé avec 150 ml d'eau. La phase organique est séchée avec Na₂SO₄. Le résidu obtenu est purifié sur colonne de silice (heptane / éther : 7/3). On obtient 1,51 g (3.9 mmol) d'huile jaune.

Rendement : 93 %.

RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,32 - 1,70 (m, 15H, 3 CH₂, 3CH₃) ; 2,31 - 2,36 (t, 2H, J = 7,5 Hz, CH₂) ; 3,07 - 3,14 (pseudo-q, 2H, J = 6,2 Hz, CH₂) ; 3,26 - 3,31 (t, 2H, J = 6,6 Hz, CH₂) ; 4,29 - 4,35 (t, 2H, J = 6,9 Hz, CH₂) ; 4,55 (br s, 1H, NH).

Hexanoate de 6-amino-[(2-iodo)-éthyle] ; trifluoroacétate **7**.



C₁₀H₁₇F₃INO₄

399,15 g/mol

(Mouro et al., 2002)

1,51 g (3.9 mmol) du produit **6** est mis en solution dans 10 ml de CH₂Cl₂ fraîchement distillé. 10 ml de TFA anhydre sont ajoutés goutte-à-goutte à cette solution maintenue à 0°C. On laisse la réaction à 0 °C pendant 30 min sous agitation, puis on chauffe à 20 °C for 45 min. Le mélange réactionnel est alors refroidi à -78 °C et lyophilisé pour éviter d'exposer **7** à la chaleur. L'huile jaune obtenue est reprise dans 10 ml de CHCl₃ et mise à sec à nouveau pour éliminer le TFA résiduel. On répète cette opération une seconde fois pour s'assurer de l'élimination du TFA. Le résidu est repris dans du méthanol et recristallisé dans un mélange isopropanol / hexane. On obtient 1.45 g de composé **7** (3,63 mmol) sous forme de poudre jaune blanche.

Rendement : 93%

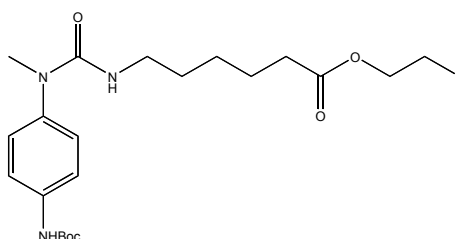
RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,30 - 1,40 (m, 2H, CH₂) ; 1,64 - 1,76 (m, 4H, 2CH₂) ; 2,39 - 2,47 (t, 2H, J = 7,2 Hz, CH₂) ; 2,84 - 2,91 (t, 2H, J = 7,1 Hz, CH₂) ; 3,19 - 3,26 (t, 2H, J = 6,7 Hz, CH₂) ; 4,29 - 4,35 (t, 2H, J = 6,7 Hz, CH₂) ; 7,8 (br s, 2H, NH₂).

RMN-¹H (CD₃OD) : δ = 1, 42 - 1,54 (m, 2H, CH₂) ; 1,54 -1,65 (m, 4H, 2CH₂) ; 2,25 - 2,32 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 2,92 - 2,99 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 3,36 - 3,43 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH₂) ; 4,32 - 4,38 (t, 2H, J = 6,4 Hz, CH₂).

RMN-¹³C (CDCl₃) : δ = 1,48 ; 24,6 ; 26,2 ; 31,2 ; 34,1 ; 40,4 ; 64,9 et 173,7.

MS (ESI, ion positif 130 eV) : calculé pour (C₈H₁₇NO₂I)⁺ : 286,13; trouvé : 286,03.

6-N-[N'-méthyl-N'-para-(terbutoxycarbonyl-amino)-phenylurée]-hexanoate de (2-iodo)-éthyl -8.



C₂₁H₃₂IN₃O₅

533,40 g/mol

(Chatrenet, 1990)

A une solution de 2 ml de CH₂Cl₂ / DMSO (20/1) on ajoute 253 mg (0,83 mmol) de 3 et 426 mg (1,06 mmol, 1,1 éq.) de 7. On additionne goutte-à-goutte 300 µl (2,13 mmol, 2,4 éq.) de triéthylamine. On laisse sous agitation la nuit à température ambiante. On ajoute 15 ml de CH₂Cl₂ et on effectue trois lavages à l'eau et un lavage avec une solution saturée en NaCl. Après séchage et évaporation de la phase organique, on chromatographie le mélange sur une colonne de silice (AcOEt/hexane 6/4). On obtient 388 mg d'huile jaune.

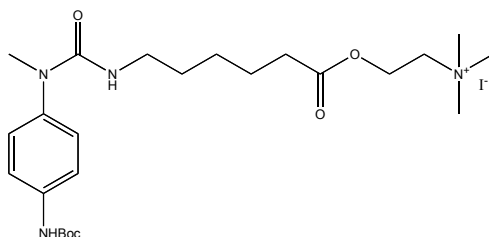
Rendement : 81 %.

RMN-¹H (CDCl₃) : δ = 1,23 – 1,72 (m, 15H, 3 CH₃, 3 CH₂) ; 2,29-2,34 (t, 2H, J = 7,5 Hz, CH₂) ; 3,11 – 3,16 (pseudo-q, 2H, J = 6,5 Hz, CH₂) ; 3,22 (s, 3H, CH₃) ; 3,26 – 3,31 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂) ; 4,29 – 4,35 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH₂) ; 6,66 (br s, 1H, NH) ; 7,15 – 7,27 (d, 2H, J = 8,6 Hz, 2 CH) ; 7,41-7,44 (d, 2H, J = 9,0 Hz, 2 CH).

UV : λ_{max} = 249 nm

ε_{249 nm} = 17 000 M⁻¹cm⁻¹

Iodure de 6-N-[N'-méthyl-N'-para-(terbutoxycarbonyl-amino)-phenylurée]
hexanoate de (2-triméthylammonium)-éthyl 9.



592,21 g/mol

Précautions : la triméthylamine est un gaz ($T_{\text{éb}} = 3\text{-}4\text{ }^{\circ}\text{C}$) toxique qui sent très fort. Manipuler avec précaution toujours sous la hotte et avec une double paire de gants. Toute la verrerie, les tuyaux, les gants et le matériel divers doit être plongé dans un bain d'HCl 5% avant d'être retiré de la hotte.

1) Saturation du toluène en triméthylamine : la triméthylamine est commercialisée en solution dans l'eau ou sous forme gazeuse. Il nous faut dans un premier temps la solubiliser dans le toluène.

Montage : Tous le matériel nécessaire à cette saturation doit être placé à l'étuve puis au dessiccateur afin de garder des conditions rigoureusement anhydres. Un premier bicol, contenant 250 ml de triméthylamine 45 % dans H_2O , est placé dans un bain d'huile sur plaque chauffante agitante. Celui-ci est surmonté d'un ballon d'argon relié par un robinet pour réguler le débit. L'autre sortie est reliée par des tuyaux neufs à deux fioles de garde contenant des pastilles de soude, afin de piéger l'eau. Après ces fioles de garde se trouve un deuxième ballon bicol contenant environ 120 ml de toluène distillé, dans lequel bulle la triméthylamine, via une pipette pasteur et un joint sovirel. Après le second ballon, il y a trois fioles de garde : la première contient des pastilles de soude afin de garder le toluène dans des conditions anhydres, la seconde est vide afin d'isoler la première de la troisième qui contient une solution d'HCl 10 %, pour neutraliser l'excès de triméthylamine.

Les deux solutions sont agitées dans un premier temps à température ambiante, jusqu'à ce qu'il n'y ait pratiquement plus d'évolution gazeuse. Le flux gazeux peut être régulé à l'aide du robinet situé entre le ballon d'argon et le premier ballon. On plonge ensuite le ballon contenant le toluène dans un bain de glace + sel. Le dégagement gazeux s'intensifie. Puis on chauffe progressivement le ballon d'eau à 45°C maximum. Il se peut qu'il y ait un

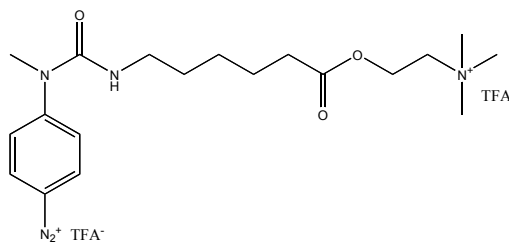
dégagement de triméthylamine dans le piège contenant HCl avant saturation complète du toluène si le débit est trop important. Lorsqu'il n'y a presque plus de dégagement gazeux (au bout de 2 h environ), ajouter une par une des pastilles de soude dans le ballon d'eau. Ceci permet de déprotonner la triméthylamine et de faciliter ainsi le dégagement gazeux. Ajouter ainsi des pastilles jusqu'à saturation complète du toluène (45 min environ), visible lorsque des bulles se forment dans la fiole contenant l'acide.

2) Synthèse de 9: A 320 mg de **8**, on ajoute lentement, sous agitation, 35 ml de toluène saturé en triméthylamine. On laisse la réaction évoluer à température ambiante sous agitation. Il se forme un léger précipité blanc. Au bout de 24 h, on ajoute 20 ml de toluène saturé en triméthylamine. Au bout de 70 h, la réaction ne semble plus évoluer (difficile de suivre la réaction par CCM car le produit n'est pas soluble dans le toluène). On évapore le toluène sous la hotte à la pompe à palette. On reprend le précipité dans 8 ml de toluène anhydre (très fraîchement distillé) et on met dans 4 tubes eppendorfs de 2 ml. On centrifuge 3 min à vitesse 12 sur une centrifugeuse Beckman Microfuge 11. On récupère un culot jaune au fond du tube eppendorf. Afin de laver ce culot, on remplace le surnageant par du toluène anhydre et on répète 5 fois la centrifugation. Le composé **9** étant très hygroscopique, il est important de le laisser le minimum de temps en contact avec l'air. On arrête de laver les culots lorsque ceux-ci commencent à prendre l'eau (très hygroscopiques). On laisse les culots dans les eppendorfs et on évapore le solvant toute la nuit à la pompe à palette. On obtient ainsi 305 mg (0,51 mmol) de cristaux floconneux jaune clair que l'on stocke dans les tubes éppendorfs à -20°C. On effectue la RMN dans DMSO-D₆ pour vérifier l'état de pureté du produit. Le produit étant pur, il est inutile de faire une étape de purification.

Rendement : 82%

RMN-¹H (DMSO-D₆) : δ = 1,18 - 1,63 (m, 15H, 3 CH₃, 3 CH₂) ; 2,32 - 2,39 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH₂) ; 2,93 - 3,00 (pseudo-q, 2H, J = 6,2 Hz, CH₂) ; 3,09 (s, 3H, CH₃) ; 3,14 (s, 9 H, 3 CH₃) ; 3,64 - 3,69 (m, 2H, CH₂) ; 4,46 (m, 2H, CH₂) ; 5,67 - 5,73 (t, 1H, J = 5,6 Hz, NH) ; 7,10 - 7,15 (d, 2H, J = 8,8 Hz, 2 CH) ; 7,45-7,49 (d, 2H, J = 8,6 Hz, 2 CH) ; 9,4 (br. S, 1H, NH).

6-N-[N'-méthyl-N'-(para-diazonium)-phenylurée] hexanoate de (2-triméthylammonium)-éthyl ; Trifluoroacétate **AC5**.



$C_{23}H_{31}F_6N_5O_7$

603,51 g/mol

(Chatrenet, 1990)

Précautions: le produit final **AC5** étant très photosensible, il convient de faire la synthèse et la purification dans une chambre noire, éclairée avec une lampe jaune au sodium de marque Osram (Modèle Vialox NAV-E 70 W/E SON-E).

On ajoute goutte-à-goutte et à froid 500 μ l (6,5 mmol) de TFA anhydre à 70 mg (128 μ mol) de **9**. On laisse la réaction évoluer 30 min à température ambiante, puis on refroidit le mélange à -10 °C. On ajoute alors, en six petites quantités (5 ajouts de 10 μ l et un de 5 μ l) sur une période de 30 min, 55 μ l (154 μ moles, 1,2 éq.) d'une solution aqueuse de $NaNO_2$ à 213 mg/ml. L'évolution de la réaction est suivie par spectrométrie UV-visible en diluant 0,5 μ l du mélange réactionnel dans 5 ml d' H_2O . On voit nettement apparaître un pic à 362 nm caractéristique de l'aryldiazonium formé. On arrête la réaction lorsqu'il n'y a plus d'évolution spectrale. La solution est alors évaporée; on resuspend le produit dans 1ml d' H_2O et on lyophilise ainsi deux fois afin de bien éliminer l'acide trifluoroacétique.

On récupère ainsi 1 ml de solution aqueuse d'**AC5** dont on mesure la concentration (64 mM) par spectrométrie UV-visible.

On mesure la pureté du produit par RMN et par CLHP (colonne phase inverse C18 10 μ -Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm): pureté 97 %. Le sous-produit (3 %) a été identifié comme l'acide dérivé de l'hydrolyse d'**AC5** (**PH5**). Les temps de rétention respectifs d'**AC5** et de **PH5** sont, en mode isocratique 5 % ACN, de 21 et 17 min.

Rendement : 97 %

La purification éventuelle d'**AC5** (après stockage prolongé à $-80^\circ C$ ou si le pourcentage de **PH5** est trop important après synthèse) se fait par HPLC (colonne phase inverse C18 10 μ -X-Tera Waters 250 X 10 mm) en mode isocratique 7 % ACN. Les temps de rétention

respectifs d'**AC5** et de **PH5** dans ces conditions sont 15 et 28 min. A noter que l'ordre de sortie d'**AC5** et de **PH5** est inversé entre la colonne X-Tera et la colonne Hyperbond.

AC5 est conservé à -80°C par aliquots de 50 μl (100 mM dans H_2O).

RMN- ^1H (D_2O) δ = 1,26 - 1,68 (m, 6H, 3 CH_2) ; 2,39 - 2,46 (t, 2H, J = 7,3 Hz, CH_2) ; 3,16 (s, 9 H, 3 CH_3) ; 3,20 - 3,27 (t, 2H, J = 6,8 Hz, CH_2) ; 3,37 (s, 3H, CH_3) ; 3,65 - 3,70 (m, 2H, CH_2) ; 4,50 - 4,53 (m, 2H, CH_2) ; 7,49 - 7,53 (d, 2H, J = 9,5 Hz, 2 CH) ; 8,29 - 8,34 (d, 2H, J = 9,5 Hz, 2 CH).

UV : λ_{max} = 362 nm

$\epsilon_{362 \text{ nm}}$ = 23400 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

MS (ESI, ion positif 130 eV) :

AC5 : calculée pour $(\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_5\text{O}_3)^{2+}/2$: 188,62 ; trouvée : 189,27.

PH5 : calculée pour $(\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_3)^+$: 291,35 ; trouvée : 291,50.

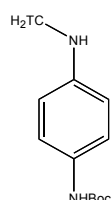
Remarque : pour **AC5** et **PH5**, on observe un pic en spectrométrie de masse correspondant à une perte de deux azote et d'une charge. Vraisemblablement une réaction photochimique et/ou thermique a lieu dans l'appareil et il nous est possible de voir un intermédiaire de la réaction : le carbocation.

Carbocation d'AC5 : calculée pour $(\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3)^{2+}/2$: 175,12 ; trouvée : 175,31.

Carbocation de PH5 : calculée pour $(\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_3)^+$: 264,15 ; trouvée : 263,59.

C) Synthèse du radioligand [^3H]AC5

N-([^3H]-méthyl)-N'-terbutoxycarbonyl *para*-phénylènediamine [^3H]-2.



$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$

224,29 g/mol

(Combeau et al., 1994)

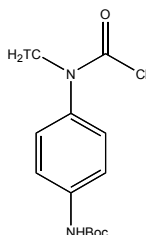
Cette étape a été réalisée au CEA Saclay par Doris.

A.S. : 6,5 Ci / mmol

Activité volumique : 1,56 mCi / ml

Activité totale : 4 X 14 mCi = 56 mCi

N-([³H]-méthyl)-N-chloroformyl-N'-terbutoxycarbonyl-*para*-
phénylènediamine [³H]-3.



C₁₃H₁₆TCIN₂O₃

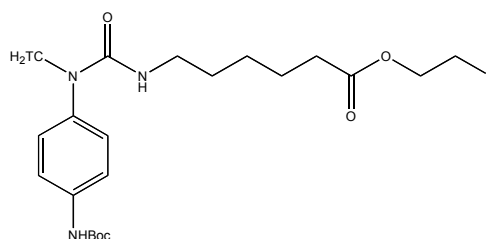
286,75 g/mol

(Klotz et al., 1991)

2,86 ml (12,9 μmol) d'une solution à 1 mg/ml de **2** dans CH₂Cl₂ sont ajoutés à la solution méthanolique de 9 ml (2,15 μmol, 14 mCi, 6,5 Ci/mmol) de [³H]-**2**. On effectue ainsi une dilution isotopique de 7 fois : A.S._{finale} = 0,93 Ci/mmol. On amène cette solution à sec, puis on ajoute 300 μl d'une solution de toluène contenant 1,2% de triéthylamine (26,3 μmol, 1,75 éq). On refroidit le mélange à 0°C avant d'ajouter 39,6 μl (75,25 μmol, 5 éq.) de phosgène 20% dans toluène. On chauffe 2 h à 30°C puis 30 min à 50°C. On ajoute alors 1 ml de toluène anhydre et 1 ml d'H₂O, on agite vigoureusement, puis on récupère la phase organique (au-dessus) à l'aide d'une pipette pasteur. La phase organique est alors séchée sur Na₂SO₄, évaporée, mise à sec sous le vide de la pompe à palette puis reprise dans 1 ml de CH₂Cl₂. Un aliquot de 5 μl de chaque phase est analysé par CLHP (Gradient 1, colonne phase inverse C18 10 μ-Hyperbond Hypersil Bondex 300*3,9 mm, Tr = 35 min). On récupère 13,3 mCi (14 μmol) de [³H]-**3**.

Rendement radiochimique : 93%

6-N-[N'-[³H]méthyl-N'-para-(terbutoxycarbonyl-amino)-phenylurée]-hexanoate de (2-iodo)-éthyl [³H]-8.



C₂₁H₃₁TiN₃O₅

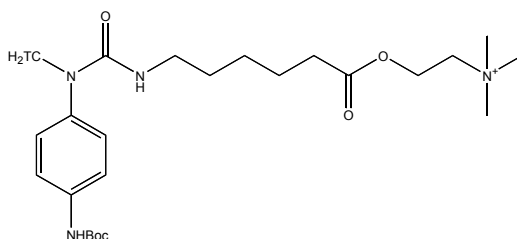
535,41 g/mol

(Mouro et al., 2002)

4 mg (14 μmol, 13,3 mCi) de [³H]-3 et 7,2 mg (18 μmol 1,3 éq.) de 7 sont mis en solution dans 300 μl de CH₂Cl₂ fraîchement distillé. On ajoute 5 μl (36,1 μmol, 2,6 équivalents) de triéthylamine. On laisse la réaction évoluer sous agitation à température ambiante. La réaction est suivie par HPLC (colonne phase inverse C18 10 μ-Hyperbond Hypersil Bondex 300*3,9 mm, gradient 1, temps de réaction 7 h). On ajoute alors 1 ml de CH₂Cl₂ et le mélange est extrait avec 1 ml d'eau. La phase aqueuse est extraite à nouveau avec 1 ml de CH₂Cl₂ et les phases organiques sont rassemblées, séchées avec Na₂SO₄ et évaporées. Le résidu est repris dans 2 ml de CH₂Cl₂ anhydre et analysé par CLHP (gradient I, colonne phase inverse C18 10 μ-Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm ; Tr = 39 min) : le mélange contient 10.4 mCi de [³H]-8.

Rendement radiochimique : 80%

Iodure de 6-N-[N'-([³H]-méthyl)-N'-para-(terbutoxycarbonyl-amino)-phenylurée] hexanoate de (2-triméthylammonium)-éthyl [³H]-9.



C₂₄H₄₀TiN₄O₅⁺

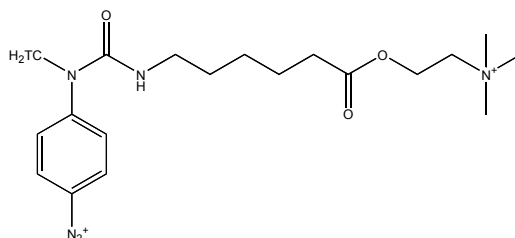
467,61 g/mol

(Mourots et al., 2002)

6 mg (11,2 μ mol, 10,4 mCi) de [^3H]-**8** sont mis en solution dans 300 μ l de toluène anhydre saturé avec Me_3N (cf. synthèse froide) et la réaction est mise sous agitation à température ambiante pendant 24 h. On évapore le solvant sous vide et le résidu est repris dans 300 μ l de toluène anhydre saturé avec Me_3N . On poursuit l'agitation pendant 70 h, toujours à température ambiante, en effectuant un deuxième changement de toluène saturé en Me_3N . On enlève alors le solvant sous vide, puis le résidu est repris dans 2 ml de toluène et extrait avec 2 ml d'eau. La phase aqueuse contient 10,2 mCi of [^3H]-**2**. Le produit brut est alors lyophilisé, repris dans 4 ml de MeOH (2,55 mCi/ml, 3 mM), analysé par CLHP (gradient I, colonne phase inverse C18 10 μ -Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm ; Tr = 29 min) et conservé à -20 °C.

Rendement radiochimique : 98%

Hexanoate de (2-triméthylammonium) -éthyl-6-N-[N'-(^3H)-méthyle]-para-diazonium-phenylurée] trifluoroacetate [^3H]-**AC5**.



$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{N}_5\text{O}_3^{2+}$

379,49 g/mol

(Mourots et al., 2002)

450 μ l (1,3 μ mol, 1,1 mCi) d'une solution méthanolique de [^3H]-**2** sont mis à sec sous vide. On refroidit le ballon à 0 °C avant d'ajouter goutte-à-goutte 300 μ l de TFA refroidi lui aussi à 0°C. On laisse alors le mélange réactionnel remonter à 15°C pendant 30 minutes sous agitation, permettant ainsi une déprotection totale du groupement amine. Le mélange est alors refroidi à -10 °C et maintenu dans le noir. Une solution aqueuse de NaNO_2 (1,2 éq., 8,3 mg / ml) est ajoutée en trois fois 10 μ l sur 30 minutes. Le mélange est alors évaporé et lyophilisé deux fois avec 1 ml d'eau (pour enlever l'excès de TFA) avant la purification CLHP (gradient II, colonne phase inverse C18 10 μ -Hyperbond Hypersil Bondex 300 X 3,9 mm ; Tr = 21

min). Après purification on obtient [³H]-AC5 avec une pureté supérieure à 95 % (confirmée par les analyses CLHP et UV) et un bon rendement radiochimique (60%).

[³H]-AC5 est alors aliquoté et conservé en solution aqueuse (385 µM) au noir et à – 80°C.

Rendement radiochimique : 60%.

VIII) Partie expérimentale biochimique

A) Généralités :

Tampon A : Tris HCl 50 mM, pH 7.4, EDTA 3 mM, EGTA 1 mM, PMSF 0.2 mM, aprotinine 12.5 mg/l et pepstatine 8 mg/l. Remarque : l'aprotinine peut être remplacée par 20 mg d'inhibiteur de trypsine.

Tampon B : 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2, 100 mM NaCl, 0,01 % Triton X-100, inhibiteurs de protéase Roche complete mini EDTA-free (1 comprimé/10 ml de tampon).

Tampon C : 10 mM phosphate de sodium pH 7,2, 100 mM NaCl, inhibiteurs de protéase Roche complete mini EDTA-free

Tampon D : 5 mM HEPES, pH 7,4, 82,5 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1mM MgCl₂

Mesures de radioactivité : les comptages de tritium sont réalisés après incubation des filtres 4 h minimum dans du liquide de scintillant Emulsifier-Safe (Packard) au moyen d'un compteur β à scintillation Tri-Carb 2100TR (Packard). Les comptages d'iode 125 sont effectués directement à l'aide d'un compteur γ LKB 1272 clinigamma, Wallac.

Centrifugations : les centrifugations sont réalisées sur une ultracentrifugeuse Centrikon T-2060 ou sur une centrifugeuse de paillasse Jouan BR4i.

B) Préparation membranaire (Saitoh & Changeux, 1980)

- Prélevement des organes de torpille : le récepteur est purifié à partir d'organes électriques de *Torpedo marmorata* (provenance : station biologique de Roscoff, France). Les organes sont prélevés sur les torpilles endormies dans la glace, découpés en morceaux de 1 à 2 cm³, congelés directement à -196°C dans l'azote liquide, puis conservés à -80°C.

- Préparation de membranes : lors d'une préparation membranaire, 250 g d'organes sont décongelés dans 250 ml de tampon A. Les organes sont d'abord passés au Waring Blender quelques minutes puis broyés plus finement au Virtis. Le broyat est centrifugé à 3000 g 15 minutes à 4°C puis le surnageant est filtré sur gaze et centrifugé à 30000 g 2h30 à 4°C. Le culot est remis en suspension par potterisation dans une solution

aqueuse à 35% de saccharose puis déposé sur un coussin de saccharose 35% (18 ml) recouvrant un deuxième coussin de saccharose 42% (8 ml). Après centrifugation à 90000g 5h30 à 4°C, la fraction membranaire est récupérée à l'interface des deux gradients (voir **Figure 3-6**) et lavée du saccharose par le tampon A en centrifugeant à 90000 g 30 minutes à 4°C.

- **Traitement alcalin**: la fraction obtenue précédemment est enrichie en nAChR par un traitement alcalin qui permet d'éliminer les protéines contaminantes RAPSIN (43K) et Na^+/K^+ ATPase (95 kDa) sans altérer les propriétés pharmacologiques, fonctionnelles (Neubig et al., 1979) ou structurales (Mitra et al., 1989) du récepteur de torpille. La fraction membranaire est reprise dans 3 volumes de saccharose 25% ajusté à pH 11 par NaOH 1M, puis déposée sur un coussin de saccharose 20% pH 11 (4 ml) recouvrant un deuxième coussin de saccharose 25% pH 11 (8 ml). Après centrifugation à 90000 g 30 minutes à 4°C, le culot contenant les membranes est récupéré, remis en solution dans le tampon A puis lavé par centrifugation à 90000g 30 minutes à 4°C. Le culot est resuspendu dans le tampon A, potterisé, aliquoté par fraction de 500 μl et conservé à -80°C . La préparation membranaire est vérifiée, d'une part, qualitativement sur un gel d'électrophorèse à 10% de polyacrylamide dans lequel la séparation des sous-unités est réalisée en conditions dénaturantes (**Figure 3-6**) et, d'autre part, quantitativement par un dosage de protéines (selon la méthode de Lowry modifiée pour les protéines membranaires (Peterson, 1977)) et par un dosage de sites [^{125}I] α -BgTx.

C) Dosage de sites [^{125}I] α -BgTx (Schmidt & Raftery, 1973)

Cette méthode consiste à titrer à l'équilibre les sites ACh à l'aide de l' [^{125}I] α -BgTx. Les complexes sont retenus sur un filtre DEAE de cellulose chargé positivement (DE 81, Whatman) tandis que les toxines libres (dont le pI est supérieur à 7) ne sont pas retenues. Les activités spécifiques des préparations membranaires sont comprises entre 3 et 4 nmoles de sites [^{125}I] α -BgTx par mg de protéine. Cela représente entre 43 et 58 % de protéines de récepteurs sur l'ensemble des protéines de la préparation membranaire. Le poisson électrique torpille représente par conséquent une source inestimable de récepteurs nicotiques.

D) Mesures d'hydrolyse d'AC5 en préparation membranaire

La préparation membranaire (400 nM de sites α -BgTx) est préincubée dans un tampon NaPi 10 mM contenant ou non un inhibiteur d'estérase (PMSF 1 mM ou tacrine 1 μ M ou procainamide 1 μ M ou DIFP 250 μ M) pendant 30 minutes à l'obscurité et à température ambiante puis AC5 (20 μ M) est ajouté au milieu pendant un temps t. On sépare ensuite les membranes du ligand à l'aide d'un microcon 30 kDa (Amicon n° 42407) en centrifugeant 15 minutes à 11 000 rpm et à température ambiante. Le filtrat est ensuite injecté en CLHP et élué selon le gradient 1.

E) Expériences de compétition - mesure en vitesse initiale

Les constantes de protection des différents ligands pour les sites ACh ont été déterminées à l'obscurité (en présence de la lumière inactinique utilisée pour les synthèses) et à température ambiante.

Les *pH11* sont pré-incubées en présence de 15 μ M de proadifène et de 250 μ M DIFP pendant 45 minutes dans un tampon B. Différentes concentrations de ligands (10 nM à 1 mM) sont ajoutées simultanément avec 2 nM d' $[^{125}\text{I}]\alpha$ -BgTx puis les échantillons sont filtrés (HAWP Millipore) après 6 minutes d'incubation. La radioactivité associée aux filtres est quantifiée à l'aide du compteur γ . La liaison non spécifique est déterminée en présence de 100 μ M de CCh ajoutée au début de la réaction.

F) Expériences de compétition - mesure à l'équilibre (Eldefrawi et al., 1982)

Les constantes de dissociation apparentes des ligands pour le site des BNC ont été déterminées également en lumière inactinique, à température ambiante, selon le protocole décrit dans la littérature. Les membranes sont incubées dans un tampon C en présence de 100 μ M de CCh et 250 μ M DIFP pendant 30 minutes. Des concentrations croissantes d'AC5 sont ajoutées (1 μ M à 1 mM) ainsi que 3 nM de $[^3\text{H}]\text{PCP}$ (New England Nuclear) pendant 45 minutes (jusqu'à l'équilibre). Les échantillons sont ensuite filtrés [filtres GF-B (Whatman) pré-incubés 15 minutes dans le tampon]. La radioactivité associée aux filtres est quantifiée à l'aide du compteur β . La liaison non spécifique est déterminée en présence d'une concentration saturante (1 mM) de proadifène ajoutée en même temps que les ligands.

G) Expériences de saturation

Les expériences de saturation à l'équilibre avec [^3H]AC5 sur les membranes riches en récepteurs ont également été effectuées en lumière inactinique à température ambiante. Les membranes *pH11* riches en récepteurs (4 nM de sites [^{125}I] α -BgTx) sont pré-incubées dans le tampon C avec 15 μM de proadifène et 250 μM DIFP pendant 50 minutes (volume totale de 150 ml). Des concentrations croissantes de [^3H]AC5 (de 1 à 100 nM) sont ajoutées aux membranes pendant 30 minutes (jusqu'à l'équilibre). La réaction est arrêtée en diluant les échantillons par 2,5 ml de tampon froid (maintenu à 4°C). Rapidement, le milieu d'incubation est filtré sous vide [filtres GF-C (Whatman) pré-incubés 1 heure dans une solution de 0,3% de PEI à 4°C] et les filtres sont rincés avec 2 fois 2,5 ml de tampon froid. La radioactivité associée aux filtres est quantifiée à l'aide du compteur β . La liaison non spécifique est déterminée en présence de 100 μM de CCh ajoutée 30 minutes avant l'ajout du [^3H]AC5. La concentration libre (L) de [^3H]AC5 est déterminée en faisant la différence entre la concentration totale de [^3H]AC5 (c'est-à-dire investie) et la concentration des complexes réversibles [^3H]AC5/récepteurs quantifiés ($L = L_t - RL$).

- Adams PR, Sakmann B. **1978.** *Decamethonium both opens and blocks endplate channels.* Proc Natl Acad Sci U S A 75:2994-2998.
- Bartels E. **1965.** *Relationship between acetylcholine and local anesthetics.* Biochim Biophys Acta 109:194-203.
- Brejc K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. **2001.** *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors.* Nature 411:269-276.
- Chatrenet B. **1990.** *AcChoR / Etude Topographique.* In:Strasbourg: ULP.
- Chatrenet B, Kotzba-Hibert F, Mulle C, Changeux JP, Goeldner MP, Hirth C. **1992.** *Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor.* Mol Pharmacol 41:1100-1106.
- Combeau C, Commercon A, Mioskowski C, Rousseau B, Aubert F, Goeldner M. **1994.** *Predominant labeling of beta- over alpha-tubulin from porcine brain by a photoactivatable taxoid derivative.* Biochemistry 33:6676-6683.
- Eldefrawi AT, Miller ER, Murphy DL, Eldefrawi ME. **1982.** *[3H]Phencyclidine interactions with the nicotinic acetylcholine receptor channel and its inhibition by psychotropic, antipsychotic, opiate, antidepressant, antibiotic, antiviral, and antiarrhythmic drugs.* Mol Pharmacol 22:72-81.
- Foucaud B, Perret P, Grutter T, Goeldner M. **2001.** *Cysteine mutants as chemical sensors for ligand-receptor interactions.* Trends Pharmacol Sci 22:170-173.
- Goeldner MP, Hirth CG, Rossi B, Ponzio G, Lazdunski M. **1983.** *Specific photoaffinity labeling of the digitalis binding site of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase induced by energy transfer.* Biochemistry 22:4685-4690.
- Hatanaka Y, Sadakane Y. **2002.** *Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier.* Curr Top Med Chem 2:271-288.
- Heidmann T, Changeux JP. **1979.** *Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites.* Eur J Biochem 94:281-296.
- Heidmann T, Oswald RE, Changeux JP. **1983.** *Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from torpedo marmorata.* Biochemistry 22:3112-3127.
- Kessler P, Chatrenet B, Goeldner M, Hirth C. **1990.** *1-[4-(N-Chlorocarbonyl-N-methylamino)phenyl]-2-(phenylsulfonyl)diazene, a bifunctional reagent with a protected diazonium function.* Synthesis 11:1065-1068.
- Klotz P, Chatrenet B, Coppo M, Rousseau B, Goeldner M, Hirth C. **1991.** *Synthesis of a tritiated heterobifunctional reagent, a potential tool in photoaffinity labeling technology.* J Label Compd Radiopharm 29:149-155.
- Kotzyba-Hibert F, Kapfer I, Goeldner M. **1995.** *Recent Trends In Photoaffinity Labeling.* Angewandte Chemie-International Edition 34:1296-1312.
- Mitra AK, McCarthy MP, Stroud RM. **1989.** *Three-dimensional structure of the nicotinic acetylcholine receptor and location of the major associated 43-kD cytoskeletal protein, determined at 22 Å by low dose electron microscopy and x-ray diffraction to 12.5 Å.* J Cell Biol 109:755-774.
- Mouroit A, Kotzyba-Hibert F, Doris E, Goeldner M. **2002.** *New and convenient synthesis of a tritiated photo activatable nicotinic agonist: [H-3]-AC5.* Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals 45:943-953.
- Neubig RR, Cohen JB. **1979.** *Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions.* Biochemistry 18:5464-5475.

- Neubig RR, Krodel EK, Boyd ND, Cohen JB. **1979**. *Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A 76:690-694.
- Peterson GL. **1977**. *A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable*. Anal Biochem 83:346-356.
- Saitoh T, Changeux JP. **1980**. *Phosphorylation in vitro of membrane fragments from Torpedo marmorata electric organ. Effect on membrane solubilization by detergents*. Eur J Biochem 105:51-62.
- Schmidt J, Raftery MA. **1973**. *A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors*. Anal Biochem 52:349-354.
- Song XZ, Andreeva IE, Pedersen SE. **2003**. *Site-selective agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica*. Biochemistry 42:4197-4207.
- Waksman G, Fournie-Zaluski MC, Roques B. **1976**. *Synthesis of fluorescent acyl-cholines with agonistic properties: pharmacological activity on Electrophorus electroplaque and interaction in vitro with Torpedo receptor-rich membrane fragments*. FEBS Lett 67:335-342.
- Weber M, Changeux JP. **1974**. *Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. I. Binding of the tritiated alpha-neurotoxin in the absence of effector*. Mol Pharmacol 10:1-14.
- Weber M, Changeux JP. **1974**. *Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. II. Effect of cholinergic agonists and antagonists on the binding of the tritiated alpha-neurotoxin*. Mol Pharmacol 10:15-34.

Chapitre 4 :

Photomarquage analytique

du nAChR désensibilisé

(Etat D).

I)	Profils d'incorporation d'<u>AC5</u>	96
	A) <u>AC5</u> s'incorpore majoritairement sur γ et δ	97
	B) <u>AC5</u> s'incorpore minoritairement sur α	99
	C) <u>AC5</u> ne s'incorpore pas sur β	101
II)	Analyse pharmacologique du photomarquage	105
	A) Stoechiométrie de l'incorporation	105
	B) Saturabilité du marquage	105
	C) Inhibition par différents agents cholinergiques	107
III)	Conclusion	109
IV)	Partie expérimentale	110
	A) Généralités	110
	B) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [^3H] <u>AC5</u>	110
	C) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [^3H] <u>PH5</u>	111
	D) Construction du modèle moléculaire	111
	E) Docking d'AC5 et de la nicotine dans le modèle	111
	F) Immunomarquage	112

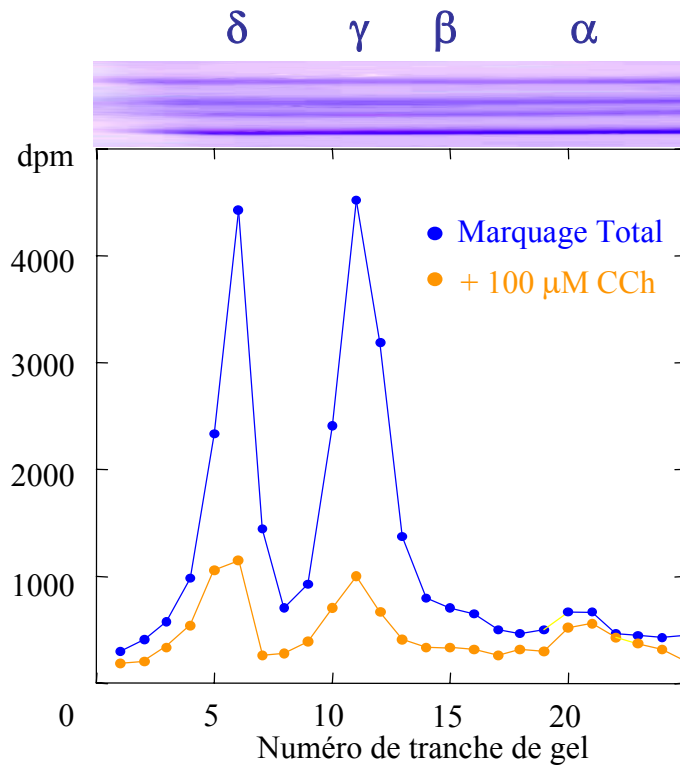


Figure 4-1: Incorporation de $[^3\text{H}]\text{AC5}$ sur le nAChR désensibilisé. Les membranes *pH11* riches en récepteur (200 nM de sites $[^{125}\text{I}]\alpha\text{-BgTx}$) sont pré-incubées avec 15 μM de proadifène en présence ou en absence de l'agoniste CCh (100 μM) pendant 45 minutes. La sonde $[^3\text{H}]\text{AC5}$ (500 nM) est alors ajoutée au milieu et incubée pendant 15 minutes à l'obscurité avant irradiation. Le milieu réactionnel est alors irradié pendant 15 minutes à 385 nm (Energie mesurée 40 μV). Les échantillons sont centrifugés et les culots repris dans le tampon de charge, puis soumis à un gel d'électrophorèse SDS-PAGE 8 %. Le gel est découpé en tranches et la radioactivité incorporée est quantifiée. Les quatre sous-unités nicotiques sont indiquées.

Dans ce chapitre, nous analysons en détail les profils de photo-incorporation de [^3H]AC5 sur le récepteur nicotinique dans l'état totalement désensibilisé D. Cet état du récepteur est thermodynamiquement stable, donc facile à étudier. Une préincubation des nAChRs avec le bloquant du canal proadifène permet en effet de provoquer l'isomérisation de la majorité des récepteurs vers cet état D (Heidmann et al., 1983).

Il a fallu dans un premier temps remettre au point les conditions de photomarquage sous cet état D. Etant donné les divergences des résultats obtenus ici par rapport à ceux rapportés précédemment au laboratoire (Chatrenet et al., 1992), il nous a fallu valider les nouveaux résultats par l'expérience et la modélisation moléculaire.

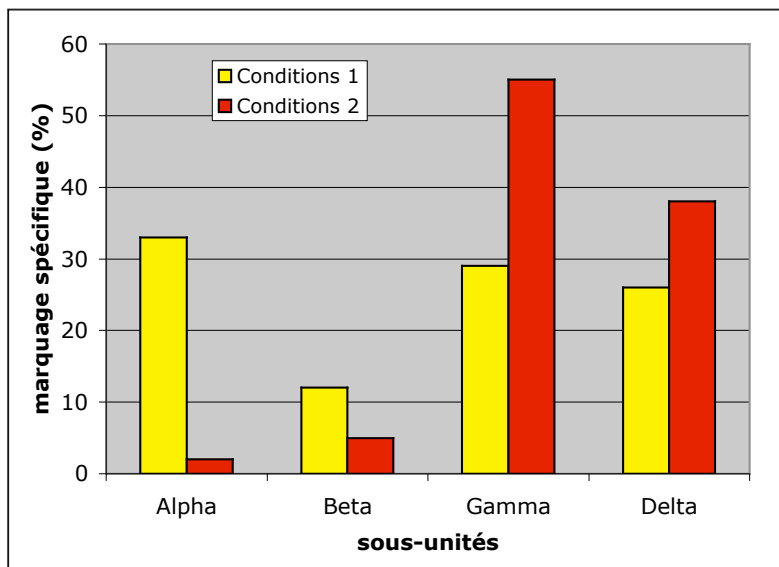
I) Profils d'incorporation d'AC5

La sonde AC5, comme nous l'avons vu au chapitre précédent, est hydrolysée par l'AChE présente à la fois dans les préparations membranaires *premiers coussins* mais aussi dans une moindre mesure en *pH11*. Les expériences décrites ci-dessous, sauf indication contraire, sont donc réalisées en membranes *pH11* préincubées 30 minutes minimum avec l'inhibiteur d'AChE DIFP (250 μM).

Les membranes riches en récepteur (200 nM de sites [^{125}I] α -BgTx) sont pré-incubées avec 15 μM de proadifène en présence ou en absence de l'agoniste CCh (100 μM , structure **Figure 2-6**) pendant 45 minutes. La sonde [^3H]AC5 (500 nM) est alors ajoutée au milieu et incubée pendant 15 minutes à l'obscurité. Dans ces conditions expérimentales, [^3H]AC5 occupe au minimum 98 % des sites ACh et la CCh permet de protéger plus de 99 % des sites ACh. Le milieu réactionnel est alors irradié pendant 15 minutes à 385 nm (Energie mesurée 40 μV). Dans ces conditions d'irradiation, plus de 95 % de l'AC5 est photolysé en 15 minutes (données non montrées). De plus, les protéines n'absorbant pas à cette longueur d'onde, nous évitons ainsi une photodégradation des récepteurs.

L'analyse électrophorétique de l'incorporation de [^3H]AC5 révèle la distribution de la radioactivité sur les différentes sous-unités (**Figure 4-1**). Dans ces conditions expérimentales, plus de 90 % du marquage spécifique est associé aux sous-unités γ et δ (52 – 57 % et 38 – 45 % respectivement), avec une incorporation mineure au niveau d' α (< 3%). Cette incorporation est protégeable par 100 μM de CCh (65 – 75 % de protection sur δ , 70 –

A



B

	Conditions 1 (Chatrenet et al., 1992)	Conditions 2
Préparation membranaire	<i>Premiers coussins</i>	<i>pH11</i>
Concentration en sites [¹²⁵I]α-BgTx	10 nM	200 nM
[AC5]	560 nM	500 nM
[CCh]	500 μM	100 μM
[DIFP]	Sans	250 μM
Cocktail d'inhibiteurs de protéases	Sans	Avec
Longueur d'onde	405 nm	385 nm
Temps d'irradiation	40 min	15 min

Figure 4.2: Répartition de l'incorporation spécifique d'AC5 sur les quatre sous-unités du nAChR de torpille sous l'état D. (A) Ce graphique illustre les différences observées entre les résultats précédemment publiés (conditions 1, en jaune, (Chatrenet et al., 1992)) et ceux actuellement obtenus (conditions 2, en rouge). Pour la condition 2, ce graphique illustre une seule expérience (la même que dans la Figure 2-1). (B) Tableau illustrant les différences expérimentales entre les conditions 1 et 2.

80 % de protection sur γ et 15-25 % sur α), ce qui montre la spécificité²⁰ de la réaction au niveau des deux sites agonistes. Un marquage protégeable (30 – 70 % par 100 μ M CCh) est observé de manière non reproductible (0 à 30 % du marquage spécifique total) au niveau de β .

Ces profils d'incorporation spécifique de [³H]AC5 sont reproductibles (mis à part pour la sous-unité β) et, de manière inattendue, en désaccord avec les résultats précédemment publiés au laboratoire (Chatrenet et al., 1992). En effet, comme on peut le voir sur la **Figure 4-2A**, on observe beaucoup moins de radioactivité associée aux sous-unités α et β que Chatrenet et collaborateurs, les sous-unités γ et δ étant de loin les plus marquées dans notre cas.

Il a donc fallu dans un premier temps comprendre la provenance de la divergence des résultats. Le tableau de la **Figure 4-2B** rassemble les différences entre les deux modes opératoires utilisés.

Parmi ces différents facteurs expérimentaux, on peut exclure assez vite le temps ou la longueur d'onde d'irradiation comme source de divergence. En effet, nous avons fait varier les longueurs d'ondes (de 290 à 410 nm) et les temps d'irradiation (de 15 à 45 min) sans observer de différences significatives du profil d'incorporation de [³H]AC5 (données non montrées).

A) AC5 s'incorpore majoritairement sur les sous-unités γ et δ

Afin d'analyser plus en détail les profils d'incorporation de la sonde sur le nAChR, nous avons décidé de construire, avec l'aide de Jordi Rodrigo et Didier Rognan du Laboratoire de Bioinformatique du Médicament (Faculté de Pharmacie, Strasbourg), un modèle structural de la région N-terminale extracellulaire du nAChR de *Torpedo californica*.

- Construction du modèle moléculaire

Ce modèle structural est construit par homologie d'après la structure à haute résolution de l'AChBP (numéro d'identification PDB: 1I9B) et les alignements de séquences réalisés entre l'AChBP et le nAChR de *Torpedo californica* ((Brejc et al., 2001), voir **Figure**

²⁰ Le marquage spécifique est calculé en réalisant la différence entre le marquage total (en absence de protecteur) et le marquage non spécifique (en présence de protecteur).

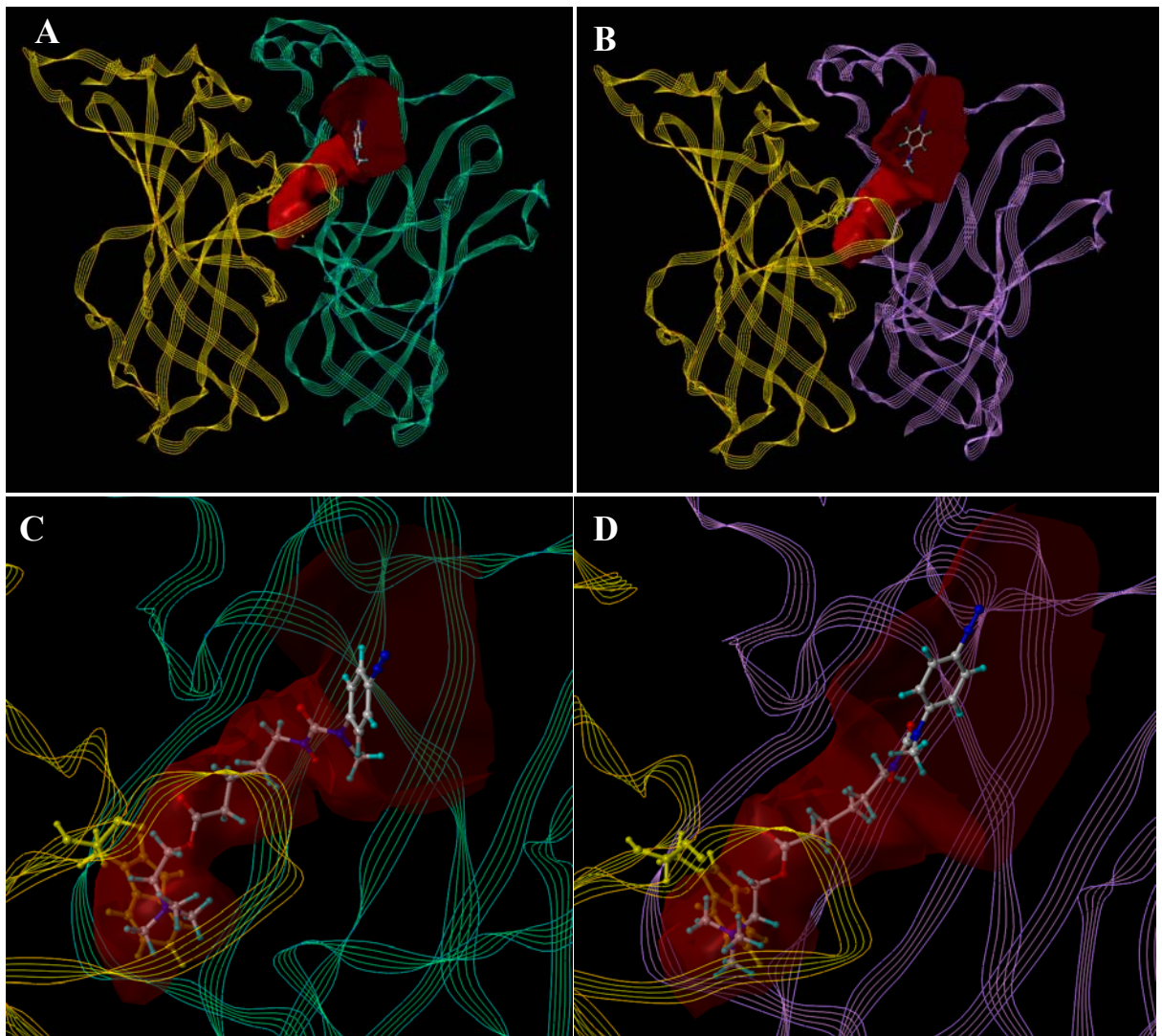


Figure 4-3: Modélisation moléculaire du nAChR de *Torpedo californica* et docking d'AC5 dans les sites ACh. (A) Modèle du dimère $\alpha\gamma$. La sous-unité α est en jaune, et la sous-unité γ en vert. La sonde AC5 est dans le site agoniste. Les surfaces différentielles entre le ligand et le récepteur sont représentées en rouge. (B) Modèle du dimère $\alpha\delta$. La sous-unité α est en jaune, et la sous-unité δ en violet. (C) et (D) Zoom sur les sites $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$. Le Trp149 de la boucle B du site agoniste, établissant des interactions cation- π avec le groupement triméthylammonium d'AC5, est représenté en jaune.

2-16). Cette approche est couramment utilisée lorsque la structure d'une protéine homologue est disponible. Il faut toutefois garder en tête les limites de cette méthode pour des homologies de séquences inférieures à 30 % (Marti-Renom et al., 2000).

La principale difficulté concernant la sous-unité α est l'insertion d'une proline dans le site agoniste, au niveau de la boucle C, au début du brin $\beta 10$. Nous avons imposé des contraintes géométriques afin de préserver l'orientations des résidus du brin $\beta 10$, et notamment l'orientation d' α Tyr198 vers le site ACh.

Une autre étape délicate est l'insertion d'un segment de 9, 7 et 11 acides aminés, sur les sous-unités β , γ et δ respectivement, au niveau de la région entre les brins $\beta 8$ et $\beta 9$. Cette région correspond à la boucle F du site agoniste pour les sous-unités γ et δ . Etant donné l'insuffisance de résultats expérimentaux concernant la structure de cette boucle, il nous est impossible de définir sa structure avec précision. Nous avons donc attribué à ces insertions des structures en boucles, en essayant de garder une structure globale compacte pour la protéine. La structure de cette boucle F appartenant aux sites ACh reste donc indéfinie dans notre modèle. Néanmoins, cette zone d'ombre ne nous posera pas de problème pour la suite car, comme nous allons le voir ci-dessous, la molécule d'AC5 n'interagit pas avec cette boucle F.

Toutes ces insertions sont bien tolérées suite à la minimisation d'énergie du modèle à l'aide des paramètres GROMOS 96 (<http://igc.ethz.ch/gromos>) (**Figure 4-3**). Tous les acides aminés importants pour la liaison des agonistes et antagonistes compétitifs se retrouvent notamment dans une cavité de 10-12 Å de diamètre.

Afin de valider notre modèle, nous avons “docké” la nicotine dans les sites agoniste $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$. La nicotine a ici l'avantage d'être une molécule très rigide, possédant un axe unique de rotation. Nous avons utilisé le programme de « docking » GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking. Version. 2.1) (Jones et al., 1997). GOLD est un programme qui utilise des algorithmes génétiques afin d'explorer une large gamme de conformations du ligand, avec une flexibilité partielle de la protéine, et qui autorise le déplacement de molécules d'eau. Dans chacun des deux sites, nous avons trouvé deux classes de solutions, dont l'une est éloignée du Trp149, et l'autre propose une position du ligand similaire à celle suggérée par modélisation (Le Novère et al., 2002) ou observée par cristallographie (Celie et al., 2004) : l'atome d'azote N2 du groupement pyrrolydine est situé notamment à proximité du carbonyl du Trp149 (données non montrées).

- Docking d'AC5 dans ce modèle

Le docking d'AC5 a également été réalisé à l'aide du programme GOLD. Nous avons été obligé d'appliquer des contraintes de distance, entre l'ammonium d'AC5 et l' α Trp149, afin d'orienter la molécule selon les données structurales que nous possédons. En effet, la molécule AC5 possède une fonction choline, des propriétés de liaison proches de celles de l'ACh, et des propriétés agonistes. La fonction acétylcholine d'AC5 doit donc pouvoir se superposer à l'ACh dans les sites agonistes. L'AChBP a été récemment cristallisée avec la CCh dans les sites ACh.

D'après notre modèle, la partie aryldiazonium d'AC5 (voir **Figure 4-3**) entre en contact majoritairement avec la composante complémentaire des sites ACh, à savoir les sous-unités γ et δ . La fonction aryldiazonium établit également des interactions limitées avec la sous-unité α . Par contre, AC5 n'établit aucune interaction avec la sous-unité β , celle-ci étant située à plus de 30 Å des sites ACh dans ce modèle.

Ce modèle est donc parfaitement en accord avec un marquage prédominant des sous-unités γ et δ sur le nAChR désensibilisé. Il est par ailleurs fort probable que la structure de l'AChBP corresponde à la conformation désensibilisée du nAChR. Il faudrait, pour répondre à cette question, pouvoir identifier sans ambiguïté les acides aminés marqués par [3 H]AC5 sous l'état D (voir chapitre 6).

B) AC5 s'incorpore minoritairement sur la sous-unité α

D'après notre modèle structural de nAChR de torpille, un marquage important de la sous-unité α (Chatrenet et al., 1992) paraît étonnant. Cependant, à ce stade, nous ne savons toujours pas si la structure de l'AChBP correspond plus à un état de repos (peu probable) ou à un état actif ou désensibilisé du récepteur (voir p 56). Il se pourrait donc que notre modèle structural du nAChR ne corresponde pas à l'état D, et que sous cet état D la sous-unité α du nAChR soit plus accessible à la fonction aryldiazonium.

Afin de valider notre marquage faible de la sous-unité α par rapport à celui prononcé de Chatrenet et collaborateurs (Chatrenet et al., 1992), nous avons effectué plusieurs contrôles.

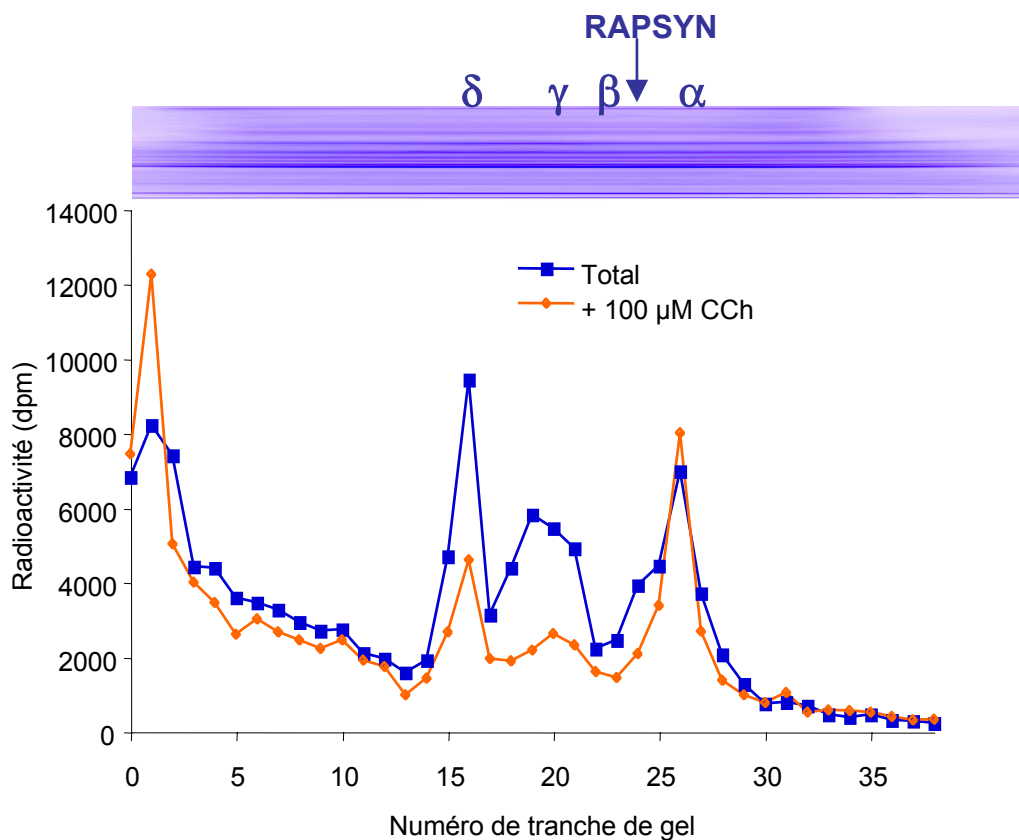


Figure 4-4: Incorporation de $[^3\text{H}]\text{AC5}$ sur les membranes *premier coussin*. Le protocole est identique à celui utilisé pour les membranes pH11 et décrit en **Figure 4-1. Les quatre sous-unités nicotiniques et la RAPSYN sont indiquées.**

- Photomarquage en absence d'inhibiteurs d'AChE

De manière surprenante, Chatrenet et collaborateurs irradièrent les *premiers coussins* sans utiliser d'inhibiteurs d'AChE (voir tableau de la **Figure 4-2** et (Chatrenet et al., 1992)). Or, comme nous l'avons montré (voir paragraphe III du chapitre 4, p 68), le temps de demi-vie d'AC5 en préparation membranaire *premier coussin* est très court. Il est donc fort probable que, dans les conditions utilisées précédemment au laboratoire, une partie du photomarquage obtenu reflète un marquage par [³H]PH5 (voir structure **Figure 3-7**), le produit d'hydrolyse de [³H]AC5. Bien que cette molécule possède une affinité réduite pour le nAChR (2,5 µM sous l'état D), elle peut occuper jusqu'à 20 % des sites ACh dans les conditions expérimentales utilisées précédemment et actuellement au laboratoire (en considérant une hydrolyse de [³H]AC5 totale).

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps effectué des expériences contrôles de photomarquage, sur *premiers coussins* et *pH11*, sans utiliser l'inhibiteur d'AChE DIFP.

Les expériences de photomarquage réalisées sur *pH11* en absence ou en présence de DIFP ne sont pas significativement différentes: plus de 90 % de la radioactivité est associée à γ et δ , et la sous-unité α n'est que faiblement marquée et de manière partiellement protégeable (profil similaire à celui de la **Figure 4-1**, données non montrées). Dans ces membranes traitées à pH11, l'activité estérasique n'est peut-être pas suffisante pour observer un marquage dû à [³H]PH5.

Les profils de radioactivité obtenus sur les membranes *premier coussin* en absence de DIFP sont représentés en **Figure 4-4**. Dans ce cas, de manière identique au marquage sur *pH11*, la majorité de la radioactivité spécifique est associée aux sous-unités γ et δ . Une partie de cette radioactivité spécifique pourrait également être attribuée à β mais, comme nous allons le voir plus loin, cette radioactivité est juste un artefact provenant de la technique d'analyse (artefact également observé avec les membranes *pH11*). La principale différence entre *premier coussin* et *pH11* se situe aux alentours de la sous-unité α . En effet, on observe entre 38 et 45 kDa un pic de radioactivité très partiellement protégeable (20 % par 100 µM CCh). Ce pic semble être associé à la fois à la sous-unité α du nAChR mais également à la protéine RAPSIN. L'analyse sur ces préparations membranaires *premier coussin* est donc plus délicate du fait de la proximité électrophorétique de ces deux protéines.

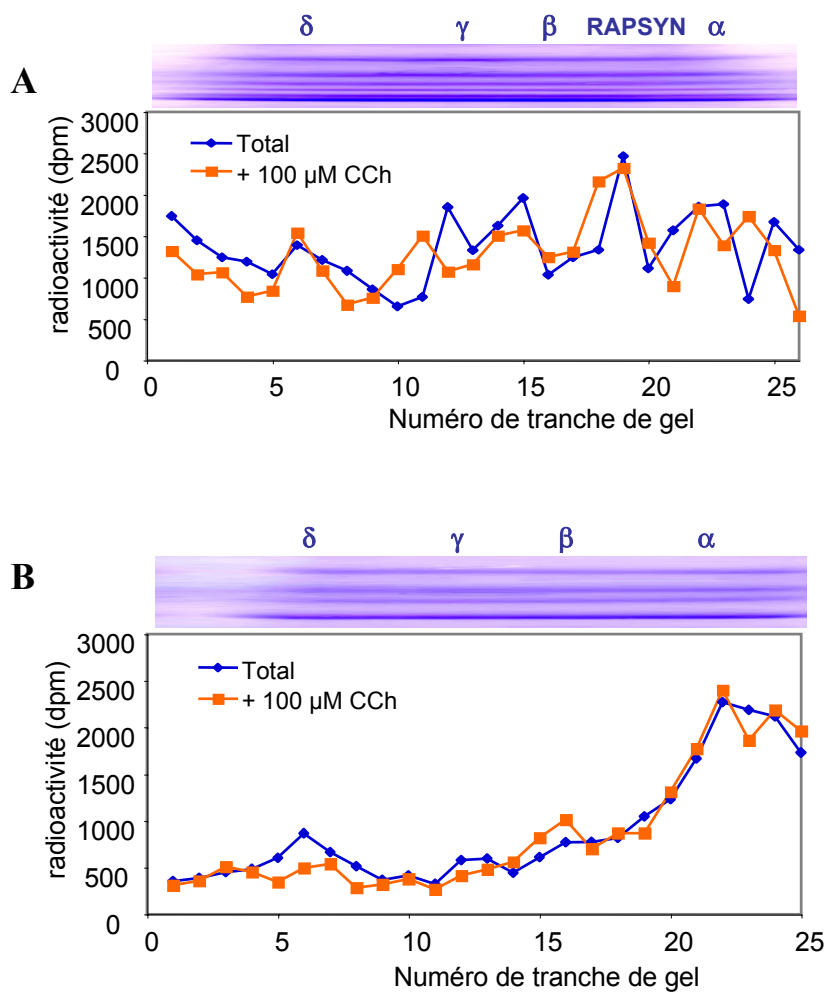


Figure 4-5: Incorporation de $[^3\text{H}]\text{PH5}$ sur les membranes *premier coussin* (A) et *pH11* (B). Le protocole est identique à celui utilisé avec $[^3\text{H}]\text{AC5}$ et décrit en Figure 4-1.

Etant donné que le traitement alcalin permet d'éliminer la RAPSYN, on se rend aisément compte sur préparations membranaires *pH11* que la sous-unité α n'est que très faiblement marquée spécifiquement par [^3H]AC5 (< 3%).

- Photomarquage avec [^3H]PH5

Le marquage de la sous-unité α décrit précédemment au laboratoire peut donc provenir soit d'une mauvaise interprétation du marquage sur *premiers coussins* (présence de RAPSYN), soit d'un marquage par [^3H]PH5. Afin de discerner entre ces deux hypothèses, nous avons purifié la molécule [^3H]PH5, qui est un sous-produit de la synthèse de [^3H]AC5, et vérifié sa pureté par CLHP.

Nous avons ensuite réalisé le photomarquage des *pH11* et des *premiers coussins*, sans DIFP, avec 500 nM de [^3H]PH5. Les profils d'incorporation de cette sonde sont représentés en **Figure 4-5**. Aucun de ces profils ne permet de distinguer clairement un marquage spécifique de cette sonde. Il semble au contraire que [^3H]PH5 s'incorpore de manière non spécifique sur les quatre sous-unités du nAChR de torpille.

Le marquage spécifique associé à la sous-unité α observé par Chatrenet et collaborateurs semble donc provenir plus d'un artefact électrophorétique que d'un marquage par [^3H]PH5. Il est donc essentiel pour nous de travailler par la suite avec les membranes traitées à pH11, afin d'éviter toute mauvaise interprétation de marquage au niveau de la sous-unité α .

C) AC5 ne s'incorpore pas sur la sous-unité β

D'après notre modèle structural de la partie N-terminale du nAChR, les deux sites ACh du récepteur sont bien trop loin de la sous-unité β pour que, à moins d'imaginer des réorganisations structurales spectaculaires du récepteur, AC5 n'établisse des interactions avec cette sous-unité. Le marquage spécifique de la sous-unité β décrit précédemment au laboratoire est donc incompatible avec les connaissances actuelles de la structure du nAChR.

De notre côté, nous observons de manière non reproductible un pic de radioactivité spécifique sur gel SDS-PAGE au niveau de la bande correspondant à la sous-unité β . Etant donné que ce pic de radioactivité au niveau de β est généralement associé à un pic moins intense qu'attendu au niveau de γ , nous avons pensé que la sous-unité γ pouvait

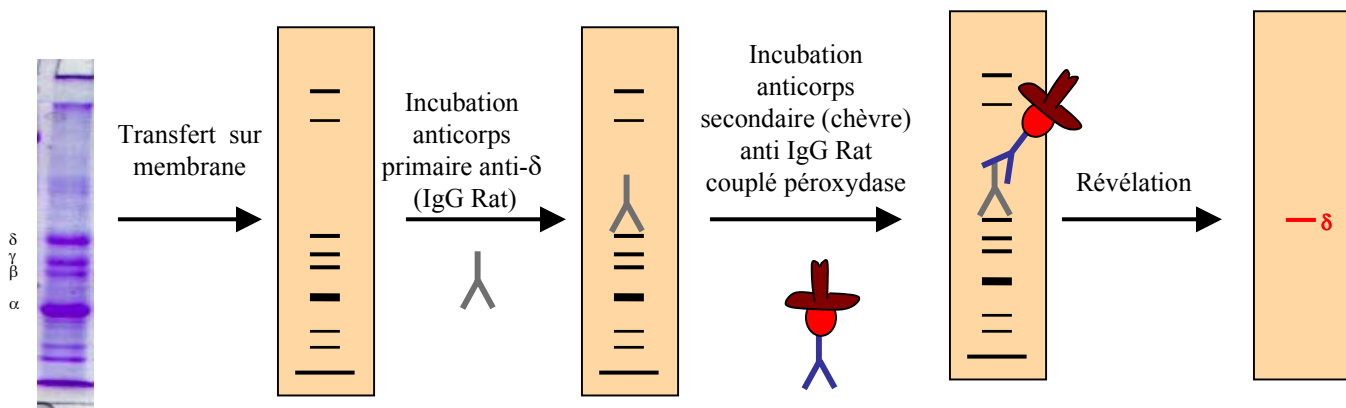


Figure 4-6: Principe du Western-blot; exemple de révélation de la sous-unité δ . Les différentes protéines contenues dans la préparation membranaire *pH11* sont séparées par SDS-PAGE puis électrotransférées sur une membrane PVDF. L'anticorps primaire anti- δ (IgG de rat) est incubé avec la membrane, puis la révélation se fait en ajoutant un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Cet anticorps secondaire est couplé à l'enzyme peroxydase. L'ajout des substrats de l'enzyme (DAB et H_2O_2) génère des produits enzymatiques colorés permettant de visualiser la bande correspondant à δ .

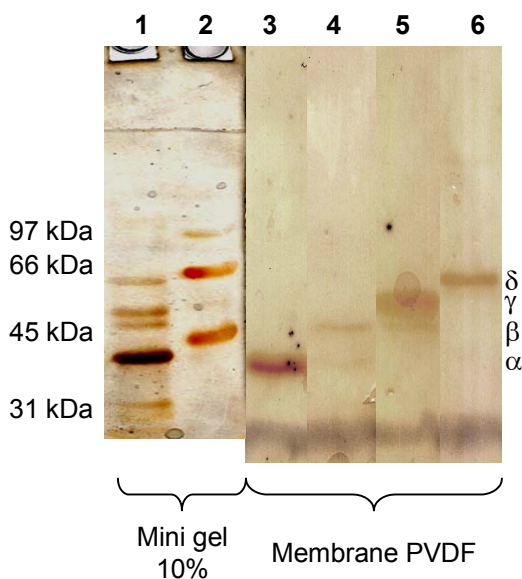


Figure 4-7: Immunomarquage des quatre sous-unités du nAChR de *Torpedo marmorata*. Les protéines des membranes *pH11* (10 μ g par puit) sont séparées sur SDS-PAGE 10 %. Les puits 1 (marqueurs de taille) et 2 (*pH11*) sont colorés à l'argent. L'autre partie du gel (puits 3 à 6) est transférée sur membrane PVDF. Cette membrane est découpée en quatre puits incubée avec les anticorps primaires anti- α (puits 3), anti- β (puits 4), anti- γ (puits 5) ou anti- δ (puits 6). Les membranes sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire anti-anticorps primaire avant d'être révélées (DAB et H_2O_2).

subir des dégradations (protéolyse, glycolyse...) lui conférant une migration électrophorétique identique à celle de la sous-unité β . En d'autres termes, la radioactivité retrouvée au niveau de β sur gel SDS-PAGE proviendrait de γ . Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons effectué deux types de contrôle:

- Immuno-marquage

L'immuno-marquage ou technique de western-blot associe 3 grands principes : (1) la séparation des protéines en fonction de leurs poids moléculaires par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) ; (2) le transfert des protéines sur une feuille de nitrocellulose ou de nylon ; et (3) la révélation immunologique par des anticorps marqués par une enzyme. Généralement, les anticorps primaires (ceux se fixant à la protéine d'intérêt) ne sont pas marqués et il faut ajouter un anticorps secondaire (dirigé contre l'anticorps primaire) marqué par une enzyme pour détecter les protéines d'intérêt. Le western blot est donc une méthode qualitative permettant de détecter des antigènes (protéines) dans des milieux complexes (**Figure 4-6**).

Nous avons donc choisi d'utiliser cette technique pour identifier la sous-unité (γ ou δ) supposée migrer au niveau de β sur gel SDS-PAGE.

Suite à une expérience de photomarquage sur *pH11* montrant une incorporation non-négligeable de radioactivité spécifique au niveau de la sous-unité β sur gel SDS-PAGE, nous avons décidé d'analyser cette préparation membranaire par Western-blot. Les différentes protéines contenues dans la préparation membranaire *pH11* ont donc été séparées sur gel SDS-PAGE 10 % puis transférées sur membrane PVDF. La **Figure 4-7** illustre la révélation de ces protéines à l'aide d'anticorps dirigés contre les sous-unités α , β , γ ou δ .

L'anticorps anti- α ne permet de révéler qu'une seule bande de 42 kDa, comme attendu. L'anticorps anti- β permet de révéler deux bandes: une majoritaire de 51 kDa (bande attendue), mais également une minoritaire aux alentours de 42 kDa, soit au même niveau que la sous-unité α . L'anticorps anti- γ permet de révéler deux bandes : une bande diffuse aux alentours de 58 kDa (bande attendue), ainsi qu'une bande aux alentours de 51 kDa, soit au même niveau que β . L'anticorps anti- δ ne révèle qu'une fine bande vers 67 kDa.

La population de sous-unités γ de cette préparation membranaire *pH11* semble donc assez hétérogène. En effet, la bande majoritaire correspondant à γ et observée sur

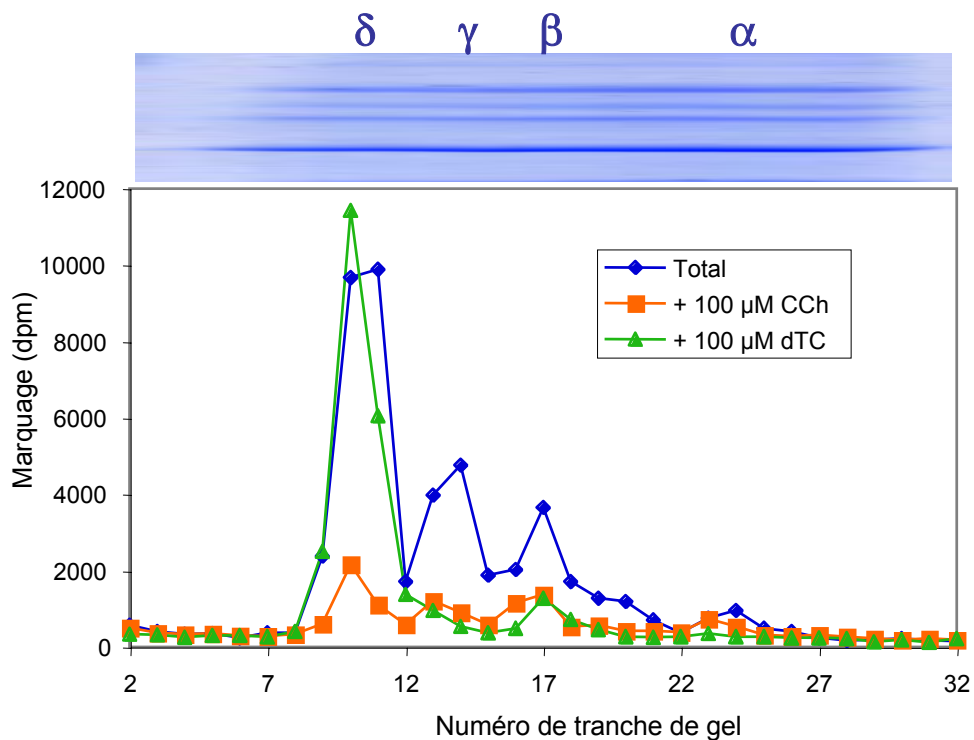


Figure 4-8: Protection sélective du photomarquage. Le photomarquage des membranes *pH11* riches en nAChR par [3 H]AC5 est réalisé selon le même protocole que celui décrit Figure 4-1. Les expériences de protection sont réalisées soit sur les deux sites agonistes par 100 μ M CCh (carrés orange), soit sélectivement sur le site $\alpha\gamma$ par 100 μ M dTC (triangles verts). Les sous-unités du nAChR sont indiquées.

la membrane PVDF s'étale sur environ 7 kDa! De plus, une deuxième bande d'intensité moindre est observé à poids moléculaire apparent plus faible. Etant donné que ce profil n'est pas significativement retrouvé d'une préparation de membrane à l'autre (données non montrées), il semble qu'il provienne plus d'une dégradation de la sous-unité γ que d'une hétérogénéité au niveau des organes électriques (hétérogénéité de glycosylation par exemple).

Etant donné qu'une partie des sous-unité γ migrent au même endroit que la sous-unité β (51 kDa), le marquage spécifique observé précédemment et actuellement au laboratoire à ce niveau semble provenir de la sous-unité γ et non de β , ni de δ .

- Protection sélective du photomarquage

Afin d'exclure complètement la sous-unité δ dans le marquage observé au niveau de β , nous avons décidé de réaliser des expériences de photomarquage dans lesquelles seul le site $\alpha\gamma$ est protégé. Il existe en effet de nombreux agents pharmacologiques possédant une sélectivité pour un des deux sites (voir partie III-G du Chapitre 3, p 42).

Le site $\alpha\gamma$ du nAChR de torpille lie effectivement préférentiellement la dTC ($K_d = 33$ nM) que le site $\alpha\delta$ ($K_d = 7$ μ M), soit une sélectivité d'environ 200 fois pour le site $\alpha\gamma$ (Neubig & Cohen, 1979; Pedersen & Cohen, 1990; Chiara & Cohen, 1997). Il est donc possible expérimentalement de mettre une quantité de dTC suffisante pour occuper la majorité des sites $\alpha\gamma$ tout en occupant les sites $\alpha\delta$ au minimum.

De la même manière que pour les expériences de Western-blot, nous avons utilisé une préparation membranaire montrant un fort taux de marquage au niveau de la sous-unité β (voir **Figure 4-8**). L'expérience menée en utilisant 100 μ M de CCh pour protéger les sites agoniste nous permet de mesurer une répartition de la radioactivité spécifique sur les sous-unités δ , γ , β et α de 55 %, 25 %, 18 % et 2 % respectivement. Si l'on compare ces résultats à ceux de la **Figure 4-1**, on se rend compte que l'augmentation de la radioactivité associée à β est concomitante à une baisse de la radioactivité associée à γ .

Sur la même préparation membranaire, nous avons ensuite effectué une protection des sites avec 100 μ M de dTC. Les résultats de cette protection, présentés en **Figure 4-8**, montrent que 100 μ M de dTC inhibent très partiellement le marquage associé à la sous-unité δ (9 %) alors qu'ils inhibent de façon significative le marquage associé aux sous-unités γ et β (74 et 65 % respectivement).

Ce résultat est donc parfaitement en accord d'une part avec la sélectivité de la dTC pour le site $\alpha\gamma$ du nAChR de *Torpedo marmorata*, et d'autre part avec le fait que le marquage observé sur gel au niveau de la sous-unité β provienne d'un marquage de la sous-unité γ . La sous-unité γ se dégrade donc vraisemblablement dans les préparations membranaires *pH11*. Nous avons noté que le marquage au niveau de β pouvait être minimisé lors de l'étape post-marquage au cours de laquelle les membranes sont resolubilisées dans le tampon de charge. Il est notamment nécessaire au cours de cette étape de ne pas laisser les membranes dans ce tampon plus d'une demi-heure et de ne pas excéder une température de 30 °C.

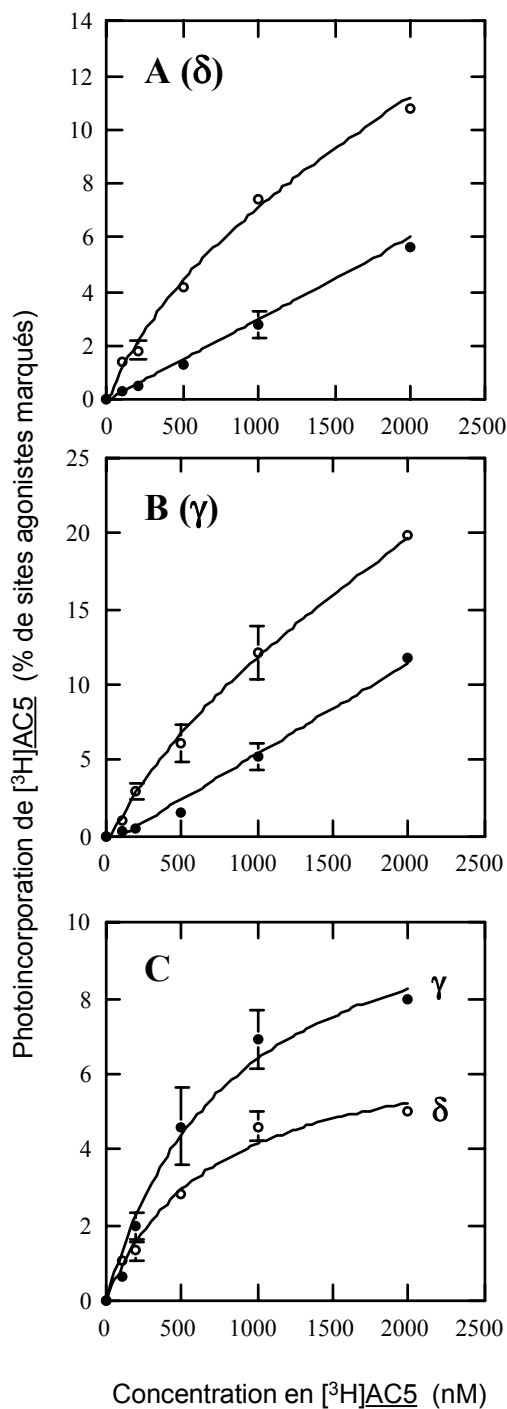


Figure 4-9: Saturation du marquage sur les sites ACh. Le photomarquage est réalisé en faisant varier les concentrations de [^3H]AC5 de 100 nM à 2 μM . Le marquage non spécifique est déterminé en présence de 100 μM CCh. Le protocole expérimental est identique à celui décrit dans la **Figure 4-1**. **(A)** Marquage total (O) et non spécifique (●) sur la sous-unité δ . **(B)** Marquage total (O) et non spécifique (●) sur la sous-unité γ . **(C)** Le marquage spécifique sur les sous-unités δ (O) et γ (●) a été calculé en soustrayant le marquage non spécifique au marquage total. Il est analysé par régression non linéaire des points expérimentaux selon l'équation:

$$M_{\text{spé}} = \frac{M_{\text{max}}}{1 + \frac{K_{\text{irr}}}{L}}$$

où $M_{\text{spé}}$ représente le marquage spécifique, M_{max} le marquage spécifique total pour une concentration L de la sonde [^3H]AC5 qui tend vers l'infini et K_{irr} la constante apparente de photomarquage pour laquelle on a 50 % de complexes irréversibles. Les symboles représentent les écarts-types de 2 à 3 expériences. Dans ces conditions on peut calculer $K_{\text{irr}\delta} = 690 \pm 220$ nM, $K_{\text{irr}\gamma} = 830 \pm 260$ nM, $M_{\text{max}\delta} = 7,0 \pm 1,9$ % et $M_{\text{max}\gamma} = 11,7 \pm 3,1$ %.

II) Analyse pharmacologique du photomarquage

Les ambiguïtés concernant les sous-unités marquées étant dissipées, nous pouvons alors réaliser une étude pharmacologique approfondie de la photoincorporation de la sonde dans les deux sites agonistes.

A) Stoechiométrie de l'incorporation

La sonde [^3H]AC5 s'incorpore donc de manière spécifique très majoritairement (> 97 %) sur les sous-unités γ (52 – 57 %) et δ (38 – 45 %) du nAChR de torpille, c'est-à-dire sur la composante complémentaire des sites ACh. Elle s'incorpore également de manière minoritaire (< 3 %) sur la sous-unité α , composante principale du site ACh.

Les deux sites agonistes sont ainsi marqués par cette sonde, le site $\alpha\gamma$ étant significativement plus marqué que le site $\alpha\delta$. AC5 possédant la même affinité pour ces deux sites, cette différence au niveau du marquage doit s'expliquer par une différence de réactivité chimique de la sonde : il est effectivement possible que dans le site $\alpha\delta$, le groupement aryldiazonium d'AC5 soit plus entouré de molécules d'eau que dans le site $\alpha\gamma$. Selon notre modèle structural du nAChR de torpille, le site $\alpha\gamma$ est effectivement plus étroit que le site $\alpha\delta$, ce qui laisse moins de degré de liberté à AC5 dans le site $\alpha\gamma$; le groupement aryldiazonium doit donc se trouver plus proche des résidus de la protéine dans le site $\alpha\gamma$, ce qui pourrait expliquer son meilleur rendement de marquage dans ce site.

Une faible proportion de la radioactivité est incorporée de manière spécifique sur la sous-unité α , mais nous ne savons pas si les deux sous-unités α sont marquées ou si seulement un des deux sites permet au groupement aryldiazonium d'être en bonne position pour établir un lien covalent avec α .

B) Saturabilité du marquage

Le photomarquage du récepteur de torpille a été exploré avec quelques concentrations de [^3H]AC5 (**Figure 4-9**).

Les constantes apparentes de photomarquage K_{irr} ne sont significativement différentes pour γ et δ , de l'ordre de 700 à 800 nM. Ces valeurs reflètent l'équivalence d'affinité d'AC5 pour les deux sites agonistes.

La photoincorporation spécifique maximale d'AC5 ($M_{\max}$) est par contre significativement différente pour γ (~ 12 %) et pour δ (~ 7 %). Cette différence de marquage ne peut pas s'expliquer, comme on l'a vu, par une différence d'affinité de la sonde mais plutôt par une différence de réactivité chimique lors de l'étape de couplage.

Ces rendements de photomarquages (de l'ordre de 10 %) sont plus faibles que ceux décrits précédemment au laboratoire: 22 % en irradiant directement (405 nm) et 34 % en irradiant par transfert d'énergie (295 nm) (Chatrenet, 1990). Ces taux de photomarquage supérieurs peuvent s'expliquer par une sous-estimation du marquage non spécifique. En effet, la concentration en sites [^{125}I] α -BgTx utilisée précédemment (10 nM) est bien inférieure à celle décrite ici (200 nM), et de surcroît, la concentration en CCh utilisée pour bloquer les sites agonistes est bien supérieure (500 μM pour Chatrenet et collaborateurs, 100 μM dans nos conditions, voir tableau de la **Figure 4-2**). La concentration de CCh que nous utilisons actuellement suffit à occuper 99 % des sites agonistes. La concentration de CCh utilisée par Chatrenet et collaborateurs va conduire la CCh à occuper non seulement les sites de haute affinité du nAChR, mais aussi de nombreux sites de basse affinité (interactions électrostatiques) présents sur toutes les protéines de la préparation membranaire. Etant donné que la CCh et AC5 sont tous les deux chargés positivement, la CCh va, à 500 μM , protéger également de nombreux sites de basse affinité. On aura donc un marquage en présence de protecteur plus faible et une information erronée sur le véritable nombre de sites ACh marqués par [^3H]AC5.

Par ailleurs, bien que des taux de couplage impressionnants aient été atteints avec le [^3H]DDF (jusqu'à 80 % sur α), antagoniste possédant également un groupement aryldiazonium comme fonction photosensible (voir structure **Figure 2-20**), ce taux de marquage des sites ACh par [^3H]AC5 ne nous paraît pas étonnant. En effet, les antagonistes [^3H]Bz₂Ch (structure **Figure 2-7**) et [^3H]TDBzCh (structure **Figure 2-20**), possédant une analogie structurale avec AC5, positionnent leur fonction photosensible majoritairement vers la composante complémentaire (γ et δ) de ces sites, à environ 10 Å de l'ammonium quaternaire (Wang et al., 2000; Chiara et al., 2003). Ces deux molécules s'incorporent dans les sites agonistes avec des rendements (2 à 10 %) proches de celui de [^3H]AC5. De plus, d'après notre docking d'AC5 dans le modèle du nAChR de torpille, la fonction aryldiazonium d'AC5 sort de la protéine. La tête photoactivable de cette sonde doit donc être entourée de nombreuses molécules d'eau qui « quenchent » la réaction de couplage avec la protéine.

Les antagonistes Bz₂Ch et TDBzCh, de la même manière que l'agoniste AC5, se lient avec des affinités identiques aux sites αγ et αδ. Par contre, pour TDBzCh, mais pas Bz₂Ch, il y a une sélectivité de couplage (6 fois) en faveur du site αγ. La fonction photosensible de TDBzCh (diazirine) réagit, de la même manière que la fonction aryldiazonium d'AC5, fortement avec l'eau. La fonction photosensible cétone de Bz₂Ch réagit par contre faiblement avec l'eau. Il serait donc fort probable, comme il apparaît sur notre modèle structural du nAChR de torpille, que le site αδ du nAChR soit beaucoup plus ouvert que le site αγ, particulièrement au niveau de la boucle complémentaire E marquée par ces antagonistes. Cette observation est donc également en accord avec une réactivité des sondes quenchée par des molécules d'eau. Il est également intéressant de noter que, de manière similaire, les agonistes [³H]Nicotine et [³H]DCTA s'incorporent majoritairement sur le site αγ, bien que les affinités de ces molécules soient identiques pour les deux sites (Middleton & Cohen, 1991; Chiara et al., 1998; Grutter et al., 2000).

C) Inhibition par différents agents cholinergiques

La non-équivalence structurale de la sous-unité complémentaire du site ACh (sous-unité γ ou δ) confère à ces sites une non-équivalence pharmacologique. La sonde [³H]AC5 marquant préférentiellement les sous-unités complémentaires des sites agonistes, il nous a paru intéressant d'étudier l'inhibition du photomarquage sur chacune de ces sous-unités par différents agents cholinergiques de profil pharmacologique plus ou moins connu.

Nous avons ainsi réalisé l'inhibition du photomarquage de [³H]AC5 par des concentrations croissantes (de 1 nM à 1 mM) de CCh, de dTC, d'épibatidine et de décéméthonium. Les données expérimentales (voir exemple de la dTC **Figure 4-10A**) peuvent être analysées selon une inhibition monophasique de type:

$$M = \frac{M_{\text{total}}}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{P} \right)^{n_H}} + M_{NS}$$

où M représente la photoincorporation de [³H]AC5, M_{total} le marquage total (en absence de protecteur), IC₅₀ la concentration de protecteur pour laquelle on a 50 % d'inhibition du marquage, P la concentration de protecteur, n_H le coefficient de Hill et M_{NS} la liaison non-

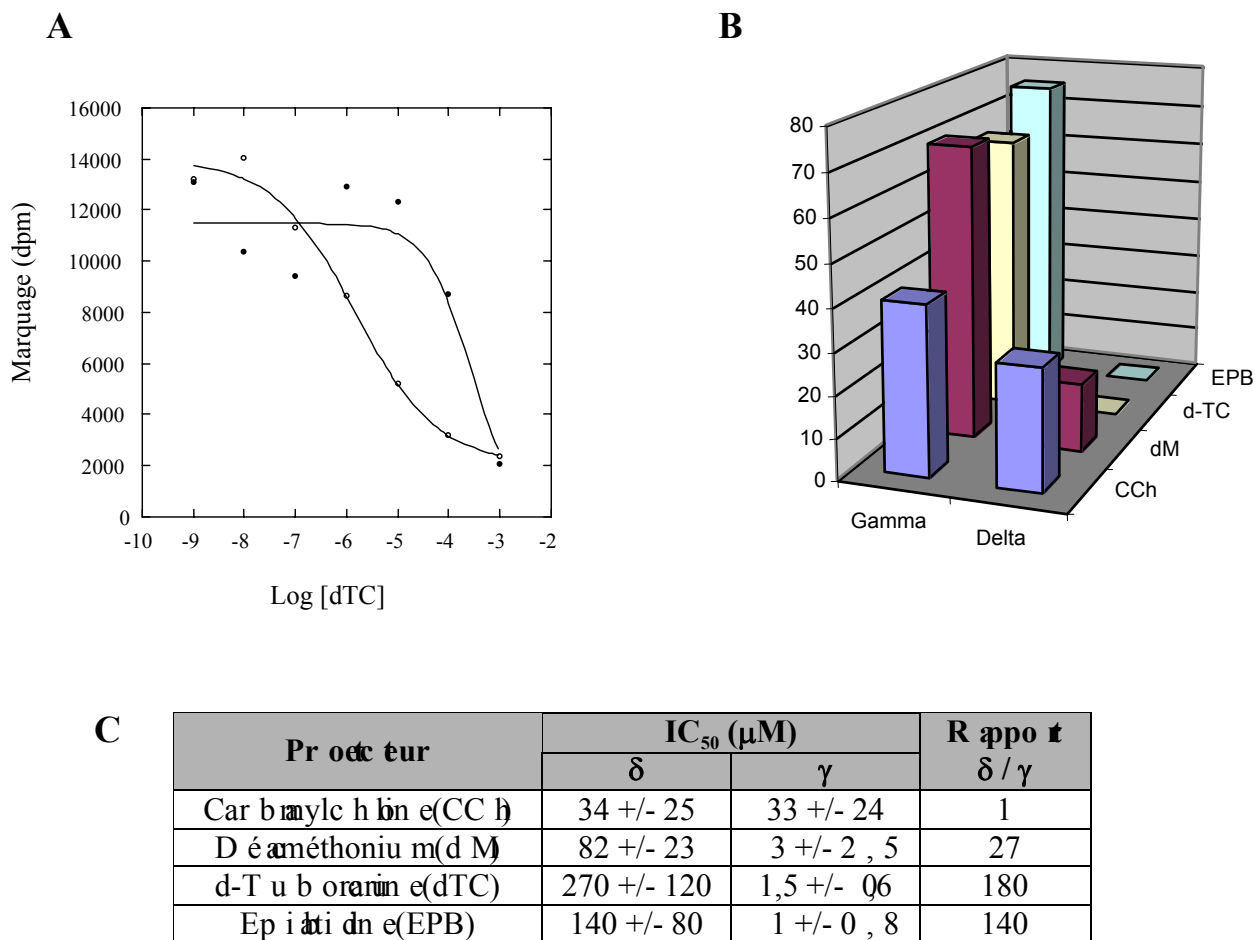


Figure 4-10: Inhibition du photomarquage par différents ligands cholinergiques. (A) Courbes d'inhibitions du marquage de [³H]AC5 sur les sous-unités γ (○) et δ (●) par des concentrations croissantes de dTC. Une régression non-linéaire des points expérimentaux permet de calculer l'IC₅₀ de la dTC sur chaque sous-unité, c'est-à-dire la concentration de dTC nécessaire à protéger la moitié du marquage. (B) Taux de protection sur les sous-unités γ et δ par 10 μM de quatre ligands cholinergiques. (C) Tableau des IC₅₀ mesurées (n = 1) sur les deux sous-unités par ces quatre ligands cholinergiques. Le rapport des IC₅₀ δ/γ est indiqué. Abréviations utilisées: CCh = carbamylcholine; dM = décaméthonium; dTC = d-tubocurarine; EPB = épipatidine.

spécifique (marquage non-protégeable en présence d'une concentration saturante en protecteur).

Les courbes d'inhibitions du marquage présentés en **Figure 4-10A** montrent clairement la sélectivité de la dTC pour le site $\alpha\gamma$. Cette molécule est effectivement le ligand cholinergique pour lequel nous ayons trouvé la plus importante sélectivité pour le site $\alpha\gamma$ (180, voir tableau de la **Figure 4-10C**). Une concentration de 10 μ M de dTC permet même de protéger exclusivement le site $\alpha\gamma$ (**Figure 4-10B**). Une sélectivité de 35 à 270 de la dTC pour le site $\alpha\gamma$ a déjà été rapportée pour le nAChR de torpille (Neubig & Cohen, 1979; Pedersen & Cohen, 1990; Chiara & Cohen, 1997). La sélectivité rapportée ici de 180 pour le site $\alpha\gamma$ est donc en parfait accord avec la littérature. Cette molécule a donc un véritable intérêt pharmacologique sur le nAChR de torpille. La sélectivité est effectivement suffisante pour nous permettre de protéger exclusivement un site ($\alpha\gamma$) par rapport à l'autre. Nous avons déjà exploité cette caractéristique pour lever l'ambiguïté concernant le marquage sur la sous-unité β (voir p 100).

La non-sélectivité d'inhibition du marquage de la CCh (**Figure 4-10C**) est également parfaitement en accord avec la littérature (Neubig & Cohen, 1979).

L'épibatidine est également un ligand possédant une très grande sélectivité d'inhibition du marquage pour le site $\alpha\gamma$ (140, voir **Figure 4-10C**). Une sélectivité de liaison de 50 pour le site $\alpha\gamma$ n'a été mise en évidence que très récemment sur le nAChR de torpille en utilisant les propriétés fluorescentes de l'agoniste Dansyl- C_6 -Cho (Song et al., 2003). Les sondes "cousines" AC5 et Dansyl- C_6 -Cho sont donc des outils pharmacologiques puissants permettant de mettre en évidence aisément une sélectivité pour un des deux sites agonistes.

Le décaminéthonium possède également une sélectivité d'inhibition pour le site $\alpha\gamma$ d'environ 30 fois (**Figure 4-10C**). Cette expérience représente, à notre connaissance, la première évidence de sélectivité de liaison du décaminéthonium pour le site $\alpha\gamma$ du nAChR de torpille. Néanmoins, cette sélectivité est trop faible pour faire du décaminéthonium un agent d'intérêt pharmacologique.

III) Conclusion

Lors des premières expériences de photomarquage analytique du nAChR sous l'état désensibilisé, nous avons été surpris de ne pas retrouver les résultats précédemment publiés au laboratoire (Chatrenet et al., 1992). Nous nous sommes alors attelés à comprendre la source de ces divergences. Des expériences complémentaires de modélisation moléculaire, d'immunomarquage et de protection sélective du photomarquage nous ont permis de remettre au point les conditions expérimentales de photomarquage (utilisation d'inhibiteur d'AChE...) et d'identifier les sous-unités γ et δ comme partenaires principaux de l'interaction avec le groupement aryldiazonium d'AC5. La sous-unité α est quant à elle très faiblement marquée par [^3H]AC5 dans ces conditions, alors que la sous-unité β ne l'est pas.

Ces nouvelles conditions expérimentales nous ont ensuite permis d'analyser en détail le caractère pharmacologique du photomarquage. La sonde [^3H]AC5 s'incorpore donc sur les sous-unités α , γ et δ dans un rapport moyen 3/54/43 et avec une incorporation maximale de 12 % dans le site $\alpha\gamma$ et de 7 % dans le site $\alpha\delta$. L'incorporation préférentielle sur la sous-unité γ par rapport à la sous-unité δ pourrait s'expliquer par un site $\alpha\gamma$ plus serré, comportant moins de molécules d'eau. Cette hypothèse pourrait par exemple être vérifiée par simulation de dynamique moléculaire. Ce site $\alpha\gamma$ est notamment le site de haute affinité pour de nombreux ligands cholinergiques, agonistes (épibatidine, décaméthonium...) aussi bien qu'antagonistes (dTC...), comme nous l'avons montré par des expériences d'inhibition de photomarquage.

Ce photomarquage analytique sous l'état thermodynamiquement stable du récepteur nicotinique étant mis au point, nous pouvons passer au photomarquage sous des états transitoires du récepteur (chapitre 5) et au photomarquage préparatif du nAChR sous l'état désensibilisé afin d'identifier les résidus marqués par [^3H]AC5 sous cet état (chapitre 6).

IV) Partie Expérimentale

A) Généralités

Tampon C: 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2, 100 mM NaCl, inhibiteurs de protéase Roche complete mini EDTA-free (1 comprimé/10 ml)

Tampon D: 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glycérol, 5 % SDS, 0,01 % bleu de bromophénol, 100 mM DTT ajouté extemporanément.

Tampon E: 10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2% BSA ou 4% lait lyophilisé.

Tampon F: 10 mM Tris, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,02 % Triton X-100.

Tampon G: 10 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 2% BSA ou 4% lait lyophilisé, 1 pastille de DAB, 0,5 g/l CaCl₂, 0,05 % H₂O₂.

Anticorps: les anticorps primaires anti-nAChR ont été produits chez le rat. Ils nous ont été gracieusement donné par Thomas Grutter (produits dans le laboratoire du Professeur Tzartos, Athènes). Les anticorps secondaires anti-IgG de rat couplé peroxydase proviennent de Roche.

L'épibatidine a été synthétisée au laboratoire par Christian Che.

B) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [³H]AC5

Une lumière incidente monochromatique provenant d'une lampe Xe/Hg de 1000 W est focalisée sur une cuve en quartz thermostatée à 10°C. Les échantillons à irradier sont placés dans cette cuve où une agitation lente à l'aide d'un barreau magnétique, permet de mélanger les différents réactants. Les membranes riches en récepteurs (200 pmoles de sites [¹²⁵I]α-BgTx) sont pré-incubées avec 15 μM de proadifène pendant 45 minutes à 4°C dans le tampon C en présence ou en absence de DIFP (250 μM). La sonde [³H]AC5 (500 nM ou différentes concentrations (de 0,1 à 2 μM) suivant les expériences) est ajoutée puis le milieu est incubé pendant 15 minutes à l'obscurité avant d'être irradié à 385 nm (40 μV) pendant 15 minutes. Les expériences de protection sont réalisées en présence de 100 μM de CCh (ou 100 μM de dTC, ou encore des concentrations croissantes (de 1 nM à 1 mM) de CCh, dTC, épibatidine ou décéméthonium suivant les expériences).

A l'issu du photomarquage les échantillons sont centrifugés à 11000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots sont repris dans le tampon de charge d'électrophorèse (Tampon D). Les échantillons sont soumis à un gel d'électrophorèse (gel de polyacrylamide réticulé à 8 %) en conditions dénaturantes (0,1% SDS). Après des étapes de coloration (solution aqueuse de 0,2 % de bleu de coomassie, 40 % de méthanol, 10 % d'acide acétique) et de décoloration (solution aqueuse de 40 % de méthanol et 10 % d'acide acétique), le gel est analysé quantitativement en le découpant en tranches régulières de 1,2 mm. Les fragments de gel, insérés dans des fioles (Packard), sont digérés par 30 % d'H₂O₂ à 80°C pendant une nuit et la radioactivité contenue dans chaque fiole est quantifiée à l'aide du compteur β.

C) Photomarquage du nAChR sous l'état D avec [³H]PH5

Les conditions expérimentales sont exactement les mêmes que celles décrites ci-dessus pour [³H]AC5. Une seule concentration en [³H]PH5 (500 nM) et une seule concentration en CCh (100 μM) ont été utilisées.

D) Construction du modèle moléculaire

Le modèle moléculaire du nAChR de *Torpedo californica* a été construit par homologie avec le programme Sybyl (TRIPOS), d'après la structure de l'AChBP (numéro d'identification PDB: 1I9B) et les alignements de séquences réalisés entre l'AChBP et le nAChR de *Torpedo californica* (Brejc et al., 2001). Ce modèle a ensuite été raffiné avec minimisation d'énergie, en utilisant le champ de force implémenté dans AMBER (7.0) (Case et al., 2002).

E) Docking d'AC5 et de la nicotine dans le modèle

La molécule d'AC5 a été construite avec le programme ChemDraw, et traduite en 3D à l'aide du programme Concord. Une minimisation rapide a été réalisée avec Sybyl, puis la molécule a été protonée. La nicotine provient de la structure cristallographique de l'AChBP (Celie et al., 2004). L'ajout des atomes d'hydrogène ainsi que la protonation de la molécule sont réalisés sur Sybyl. Le module Biopolymer de Sybyl a été utilisé pour sauver dans différents fichiers les dimères αγ et αδ. Pour chaque fichier, tous les canaux et cavités

potentiels sont détectés à l'aide du module MOLCAD (Multi Channel Function) de Sybyl. Les surfaces de Connolly et les canaux sont calculés avec une sonde de 1,4 Å de rayon. La plus grosse cavité est ensuite sélectionnée et sa surface calculée. Nous avons utilisé le programme GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking. Version. 2.1) (Jones et al., 1997) pour “docker” les deux ligands.

F) Immunomarquage

10 µg de protéine provenant de la préparation de membranes riches en nAChR sont soumis à un mini-gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE réticulé à 10 %). A l'issue de la migration, le gel est découpé en deux parties : la première sera colorée à l'argent afin de révéler les protéines totales contenues dans le gel, la deuxième sera transférée sur membrane afin de révéler avec un anticorps spécifique.

Pour la révélation à l'argent, le gel est d'abord fixé dans une solution de 40 % MeOH et 10 % AcOH pendant 15 min minimum, puis rincé deux fois avec 500 ml d'H₂O pendant 9 min. Une solution extemporanée de sodium dithionite (20 mg /l) est alors ajoutée pendant 9 min. Le révélateur (solution aqueuse de AgNO₃ 400 mg/l ; formaldéhyde 0,01 %) est alors ajouté et incubé pendant 9 min. Le gel est rincé 30 sec avec H₂O avant d'ajouter le développeur (200 ml d'une solution aqueuse de sodium carbonate 30 g/l ; formaldéhyde 37% 1 ml/l) et 200 µl d'une solution de sodium thiosulfate (10 mg/ml). La révélation est arrêtée avec une solution stop (Tris 400 mM, AcOH 2,5 %).

Le reste du gel est transféré sous agitation et à 4 °C sur une membrane PVDF. La membrane est alors saturée la nuit avec le tampon E, puis incubée 1 h à température ambiante avec le premier anticorps : anti-α (155), dilution 1/10000 ; anti-β (151), dilution 1/5000 ; anti-γ (165), dilution 1/10000 ; anti-δ (140), dilution 1/5000. La membrane est ensuite lavée quatre fois 5 min avec le tampon F, puis incubée 2h30 à température ambiante avec le deuxième anticorps (anti-IgG de rat couplé à la peroxydase). La membrane est ensuite lavée quatre fois 5 min avec le tampon F puis une fois 5 min avec le tampon E. La membrane est alors trempée dans le tampon G jusqu'à révélation des bandes. La révélation est stoppée par un bain d'eau.

- Brejč K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. **2001**. *Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors*. *Nature* 411:269-276.
- Case DA, Pearlman DA, Caldwell JW, Cheatham III TE, Wang J, Ross WS, Simmerling CL, Darden TA, Merz KM, Stanton RV, Cheng AL, Vincent JJ, Crowley M, Tsui V, Gohlke H, Radmer RJ, Duan Y, Pitera J, Massova I, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK, Kollman PA. **2002**. *AMBER 7*. In: University of California.
- Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejč K, Smit AB, Sixma TK. **2004**. *Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures*. *Neuron* 41:907-914.
- Chatrenet B. **1990**. *AcChoR / Etude Topographique*. In: Strasbourg: ULP.
- Chatrenet B, Kotzba-Hibert F, Mulle C, Changeux JP, Goeldner MP, Hirth C. **1992**. *Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor*. *Mol Pharmacol* 41:1100-1106.
- Chiara DC, Cohen JB. **1997**. *Identification of amino acids contributing to high and low affinity d-tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor*. *J Biol Chem* 272:32940-32950.
- Chiara DC, Middleton RE, Cohen JB. **1998**. *Identification of tryptophan 55 as the primary site of [3H]nicotine photoincorporation in the gamma-subunit of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor*. *FEBS Lett* 423:223-226.
- Chiara DC, Dangott LJ, Eckenhoff RG, Cohen JB. **2003**. *Identification of nicotinic acetylcholine receptor amino acids photolabeled by the volatile anesthetic halothane*. *Biochemistry* 42:13457-13467.
- Grutter T, Ehret-Sabatier L, Kotzba-Hibert F, Goeldner M. **2000**. *Photoaffinity labeling of Torpedo nicotinic receptor with the agonist [3H]DCTA: identification of amino acid residues which contribute to the binding of the ester moiety of acetylcholine*. *Biochemistry* 39:3034-3043.
- Heidmann T, Oswald RE, Changeux JP. **1983**. *Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22:3112-3127.
- Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. **1997**. *Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking*. *J Mol Biol* 267:727-748.
- Le Novere N, Grutter T, Changeux JP. **2002**. *Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3210-3215.
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. **2000**. *Comparative protein structure modeling of genes and genomes*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:291-325.
- Middleton RE, Cohen JB. **1991**. *Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label*. *Biochemistry* 30:6987-6997.
- Neubig RR, Cohen JB. **1979**. *Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions*. *Biochemistry* 18:5464-5475.
- Pedersen SE, Cohen JB. **1990**. *d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2785-2789.
- Song XZ, Andreeva IE, Pedersen SE. **2003**. *Site-selective agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica*. *Biochemistry* 42:4197-4207.
- Wang D, Chiara DC, Xie Y, Cohen JB. **2000**. *Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with 4-benzoylbenzoylcholine, a novel photoaffinity competitive antagonist*. *J Biol Chem* 275:28666-28674.

Chapitre 5 :

Photomarquage résolu en temps.

I)	Mise au point du dispositif expérimental	114
	A) Description de l'appareil de « stopped-flow »	114
	B) Photolyse d' <u>AC5</u>	115
	C) Application au photomarquage du nAChR de torpille	115
II)	Analyse du photomarquage résolu en temps	117
	A) Evolution de la photoincorporation sur chaque sous-unité	117
	B) Répartition de la photoincorporation	118
	C) Limites de la technique	119
	D) Modèle allostérique proposé	120
III)	Conclusion	125
IV)	Partie expérimentale	127
	A) Généralités	127
	B) Photolyse d' <u>AC5</u>	127
	C) Irradiation en cinétique rapide	127
	D) Irradiation en cinétique lente ou à l'équilibre	128

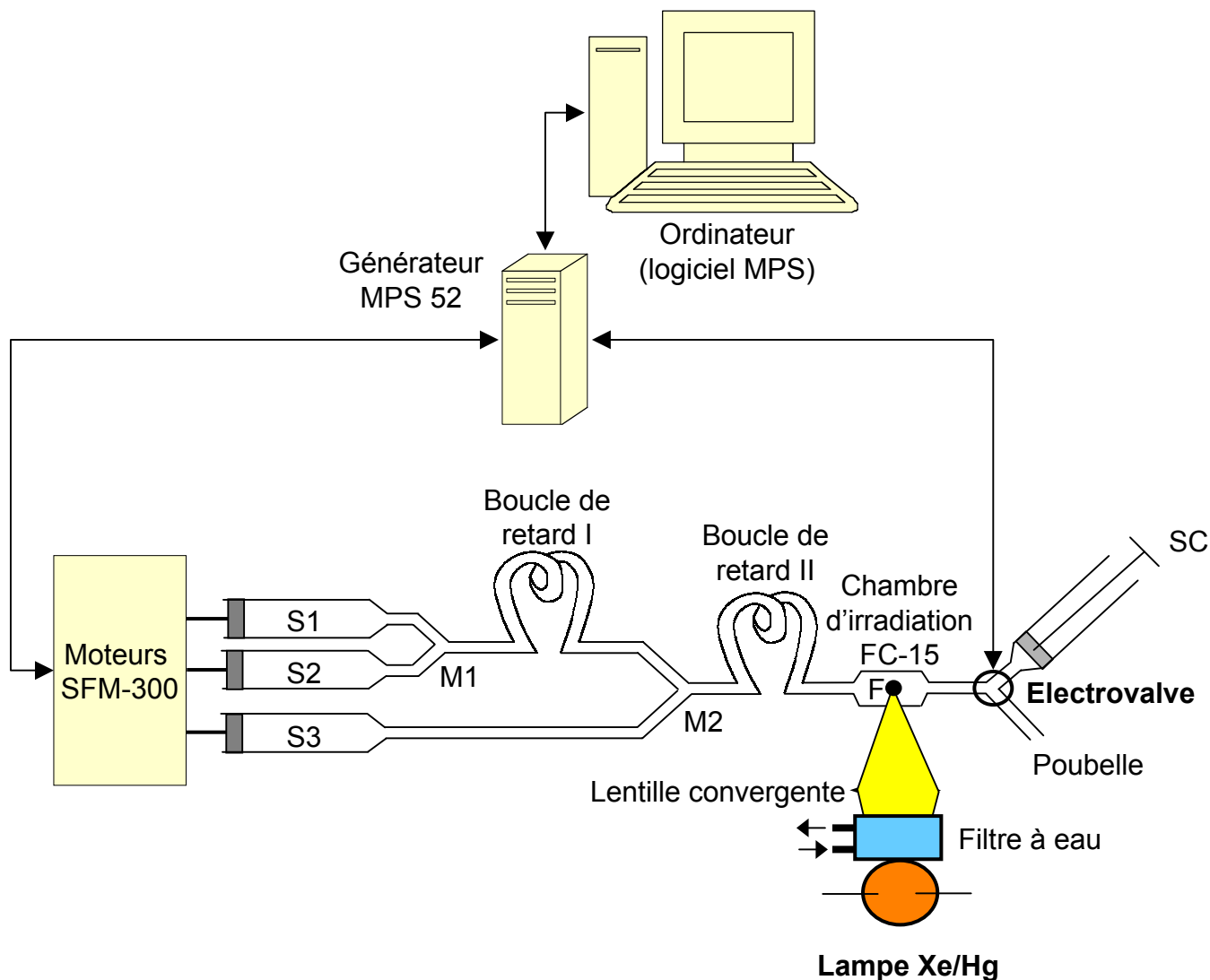


Figure 5-1: Schéma de l'appareil de mélange rapide adapté au marquage de photoaffinité. L'appareil de mélange rapide a été combiné avec une lampe haute pression Xe/Hg de 1000 W dont la lumière incidente est focalisée par une lentille convergente au niveau de la chambre d'irradiation. Un filtre à eau en amont de la lentille permet de filtrer les rayonnements infra-rouges. Le « stopped-flow » a été modifié par insertion d'une électrovalve afin de récupérer les échantillons irradiés dans une seringue de collecte (SC). Les échantillons sont chargés dans les seringues S1, S2 et S3 (classiquement CCh, nAChR et [^3H]AC5 respectivement) et trois moteurs indépendants (« stopped-flow module » SFM 300, contrôlés par le générateur « motor power supply » MPS 52) permettent de réaliser des mélanges séquentiels, programmés par ordinateur, dans les deux boucles de retard. Le temps de mélange dans la boucle de retard I (volume entre les mélangeurs M1 et M2) est fixé à 450 ms par une boucle de 190 μl (flux interrompu) tandis que le temps de mélange dans la boucle de retard II (volume entre le mélangeur M2 et le point focal F localisé au milieu de la chambre d'irradiation) est modulé, soit en changeant le volume de la boucle II (flux continu), soit en stoppant le flux dans la boucle II (flux interrompu). Le principe des expériences repose sur l'arrêt des équilibres de liaison réversible, par la lumière, au niveau de la chambre d'irradiation (« quench » optique). L'ensemble de l'appareillage est thermostaté à 10 °C.

La sonde [^3H]AC5 s'incorpore, sous l'action de la lumière, principalement sur les sous-unités complémentaires (γ et δ) des sites agonistes du nAChR sous l'état désensibilisé. En est-il de même sous les autres états transitoires du récepteur nicotinique ? Si le nAChR subit des réorganisations structurales majeures, la sonde [^3H]AC5 doit nous permettre de suivre le réarrangement de l'environnement du site agoniste au cours de la désensibilisation.

I) Mise au point du dispositif expérimental

Les états transitoires du nAChR n'étant pas, par définition, thermodynamiquement stables, il nous faut combiner un système de mélange rapide à une source UV efficace afin de « photographier » le nAChR dans des états structuraux autres que l'état D.

A) Description de l'appareil de « stopped-flow »

Nous possédons un appareil de mélange rapide adapté aux expériences de photomarquage dynamique du récepteur de torpille. Le dispositif expérimental s'inspire de celui utilisé précédemment pour le photomarquage dynamique du nAChR de torpille par le bloquant du canal [^3H]CPZ (Heidmann & Changeux, 1984; Heidmann & Changeux, 1986), par l'antagoniste compétitif [^3H]DDF (Galzi et al., 1991) et par l'agoniste partiel [^3H]DCTA (Grutter et al., 2002). La **Figure 5-1** illustre le fonctionnement du dispositif expérimental. Le principe repose sur le mélange rapide et contrôlé, dans une boucle de retard, du récepteur nicotinique avec [^3H]AC5 avant l'arrêt des équilibres de liaison réversible, par la lumière, dans une chambre d'irradiation (principe du « quench » optique). Les échantillons irradiés sont récupérés dans une seringue de collecte puis analysés. Le signal que nous quantifions est la radioactivité associée spécifiquement aux sous-unités du récepteur. Aussi, comme l'acquisition de ce signal n'est pas analysée en temps réel, nous réalisons une étude résolue en temps.

L'avantage de ce dispositif réside dans l'insertion d'une électrovalve après la chambre d'irradiation qui permet de récupérer uniquement les échantillons irradiés issus du mélange des différents réactants. L'ordre de mélange séquentiel ainsi que la coordination simultanée de l'électrovalve, sont programmés par ordinateur.

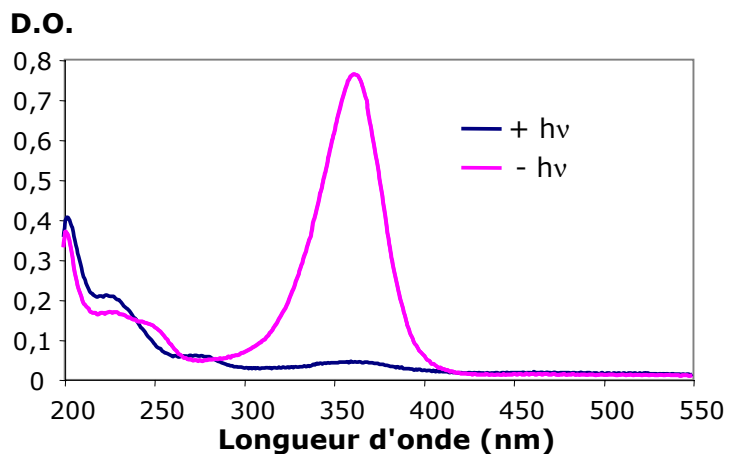


Figure 5-2: Photolyse d'AC5 via l'appareil de mélange rapide. La sonde AC5 (65 μM , seringue S1) est mélangée (1:1) avec le tampon C (S2) à une vitesse de 1 ml/s, puis irradiée (+ $h\nu$) ou non (- $h\nu$) dans la chambre d'irradiation. Le temps d'irradiation dans ces conditions est inférieur à 30 ms. L'échantillon de la seringue de collecte (SC) est analysé par spectrophotométrie. Le taux de photolyse est de 97 % dans ces conditions (mesuré à 362 nm).

L'arrêt des équilibres correspondant au mélange est réalisé par une lampe Xe/Hg polychromatique de 1000 W dont la lumière incidente est focalisée par une lentille convergente au niveau de la chambre d'irradiation (**Figure 5-1**).

B) Photolyse d'AC5

Afin de pouvoir comparer les expériences effectuées à l'équilibre (en présence de proadifène) avec celles utilisant l'appareil de mélange rapide, il est important de vérifier que la photolyse d'AC5 est aussi efficace quelles que soient les vitesses de tirs utilisées.

Les rendements de photolyse d'AC5 ont donc été déterminés à trois vitesses de tirs différentes: 1, 2 et 4 ml/s, ce qui correspond à des temps de photolyse dans la chambre d'irradiation (31 μ l) inférieurs à 30, 15 ou 7,5 ms respectivement. Ces temps respectifs correspondent donc à la résolution temporelle de l'expérience.

La **Figure 5-2** montre les spectres d'absorption d'AC5 38 μ M avec et sans irradiation à une vitesse de tir de 1 ml/s. Les rendements de photolyse sont de 97 %, 88 % et 75 % respectivement à 1, 2 et 4 ml/s. Les taux de photomarquage ne devraient donc pas être significativement différents pour des vitesses de flux de 1 à 2 ml/s. Nous n'utiliserons donc pas de temps d'irradiation inférieurs à 15 ms (vitesse de tir > 2 ml/s) pour les expériences de photomarquage: la résolution temporelle du marquage dynamique est donc limitée à 15 ms.

C) Application au photomarquage du nAChR de torpille par [³H]AC5

Le récepteur nicotinique de torpille, en absence de ligand, préexiste à 20 % sous l'état désensibilisé (Heidmann & Changeux, 1979; Boyd & Cohen, 1980). Or, nous savons que cet état désensibilisé du nAChR est également l'état de haute affinité pour les agonistes. Si ces sites de haute affinité restent libres, [³H]AC5 les occupera en premier lieu, et une partie du marquage obtenu reflètera un marquage du nAChR sous l'état D. Il faut donc présaturer ces 20 % de sites de haute affinité par une concentration submicromolaire d'ACh. Le dispositif expérimental utilisé (3 seringues, 2 boucles retard) nous permet effectivement de réaliser une présaturation de ces sites par 600 nM d'ACh pendant 450 ms (voir **Figure 5-3**). Il a été montré que cette concentration d'ACh n'est pas suffisante pour activer le récepteur (Galzi et al., 1991). Par ailleurs, le taux d'occupation des sites de haute affinité par cette concentration d'ACh est supérieur à 99 %.

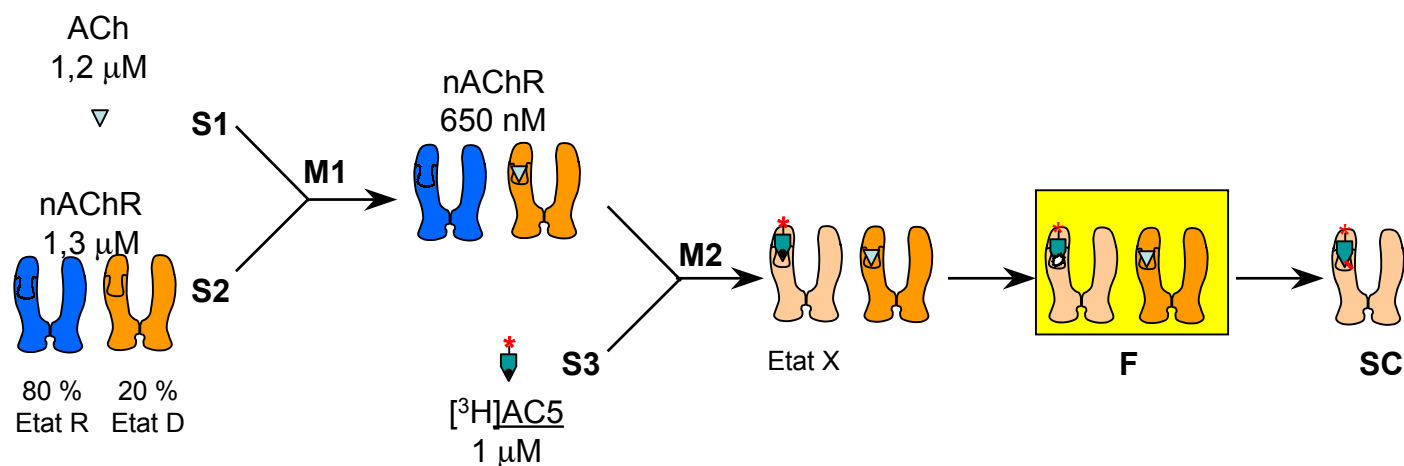


Figure 5-3: Principe du marquage de photoaffinité par $[^3\text{H}]\text{AC5}$ résolu en temps sur le nAChR de torpille. L'ACh, les membranes riches en nAChR et l'agoniste $[^3\text{H}]\text{AC5}$ sont chargés dans les seringues S1, S2 et S3 respectivement. Le contenu de chaque seringue peut être évacué indépendamment. Ce dispositif permet notamment de présaturer les 20 % de sites de haute affinité par 600 nM d'ACh, dans la boucle de retard 1 (entre M1 et M2), sans vider la seringue S3. Cette configuration évite de gaspiller inutilement la sonde radioactive $[^3\text{H}]\text{AC5}$. Après 450 ms de mélange dans la boucle retard I, l'agoniste $[^3\text{H}]\text{AC5}$ est mélangé à l'obscurité dans la boucle retard II (entre M2 et F) avec le récepteur préincubé. L'agoniste $[^3\text{H}]\text{AC5}$, en se liant au site ACh, va provoquer l'ouverture puis la désensibilisation du récepteur. Le passage des échantillons dans la chambre d'irradiation (point focal F) permet alors d'arrêter cette incubation en incorporant photochimiquement et instantanément ($< \mu\text{s}$) l'agoniste $[^3\text{H}]\text{AC5}$ dans le site ACh. Par conséquent, en modulant le temps d'incubation entre M2 et F, on devrait pouvoir photoalkyler le nAChR dans tous les états conformationnels (résolution 15 ms).

Tirs	1	2	3	4	5	6	7
Temps (ms)	200	210	20	70	30	70	27,5
S1	100	0	40	70	30	140	55
S2	100	0	0	0	0	0	0
S3	0	0	0	70	30	0	0
W/C	W	W	W	W	C	C	C
Séquence	6(1:6)7						

Tableau 5-1: Exemple de séquence de tir pour une incubation entre $[^3\text{H}]\text{AC5}$ et le nAChR de 38 ms. L'ACh, le nAChR et l'agoniste $[^3\text{H}]\text{AC5}$ sont chargés dans les seringues S1, S2 et S3 respectivement. Les sites de haute affinité du nAChR désensibilisé sont présaturés par l'ACh durant les tirs 1 et 2 (flux 1 ml/s interrompu). Afin d'éviter des contaminations, les premiers microlitres de $[^3\text{H}]\text{AC5}$ (20 μl) et du mélange dans la boucle I (40 μl) sont sacrifiés (tirs 3 et 4). Les nAChRs préincubés et $[^3\text{H}]\text{AC5}$ sont mélangés dans la boucle de retard II (volume 17 μl ; tirs 4 à 6) avec un débit de 2 ml/s. La séquence 6(1/6);7 indique que les tirs 1 à 6 sont répétés 6 fois, puis le tir 7 est réalisé. La répétition des 6 premiers tirs sert à augmenter la quantité de protéine analysée. Le septième tir sert à vider l'électrovalve dans la seringue de collecte (volume 55 μl). W = waste, C = collect.

De plus, le récepteur nicotinique de torpille est sensible à la concentration saline du milieu : à force ionique très faible, le nAChR est conduit dans un état désensibilisé (Song & Pedersen, 2000). Afin d'explorer tous les états conformationnels du nAChR, nous réalisons les expériences de photomarquage résolu en temps dans un tampon phosphate contenant 150 mM de NaCl (tampon C, voir partie expérimentale).

L'agoniste photosensible [^3H]AC5 est ensuite mélangé avec ce récepteur préincubé (voir **Figure 5-3**). Il va provoquer, à l'obscurité, la cascade de transitions conformationnelles du nAChR (activation puis désensibilisation). Le passage de ce mélange dans la chambre d'irradiation permet ensuite de "photographier" le nAChR dans un état conformationnel X. En effet, la sonde [^3H]AC5 va être excitée par la lumière et va créer quasiment instantanément ($< \mu\text{s}$) un lien covalent avec le récepteur. A la suite de l'irradiation, comme plus de 88 % du [^3H]AC5 est photolysé, aucune réaction post-photochimique ne s'effectue. La réaction photochimique étant extrêmement rapide, le récepteur n'aura pas le temps d'évoluer vers un autre état. Cet état conformationnel X piégé dépend bien sûr des propriétés agonistes d'AC5 mais aussi du temps de mélange entre cet agoniste et le récepteur. Le dispositif utilisé nous permet de faire varier les temps de mélange soit en modifiant le volume des boucles utilisées, soit en variant le débit des tirs, soit en interrompant le flux dans cette boucle de retard II. Cette technique ne nous permet donc pas de percevoir des mouvements locaux très rapides de la protéine, mais plutôt des réorganisations structurales importantes, notamment de la structure quaternaire, qui mettent plus de temps à se mettre en place.

Les échantillons sont ensuite récupérés dans la seringue de collecte, puis sont analysés par SDS-PAGE de la même manière que pour le marquage de photoaffinité à l'équilibre. Afin d'augmenter la quantité de récepteurs alkylés en vue des analyses biochimiques ultérieures, nous avons programmé 6 tirs successifs pour chaque expérience. Le **Tableau 5-1** illustre un exemple de séquence de tir.

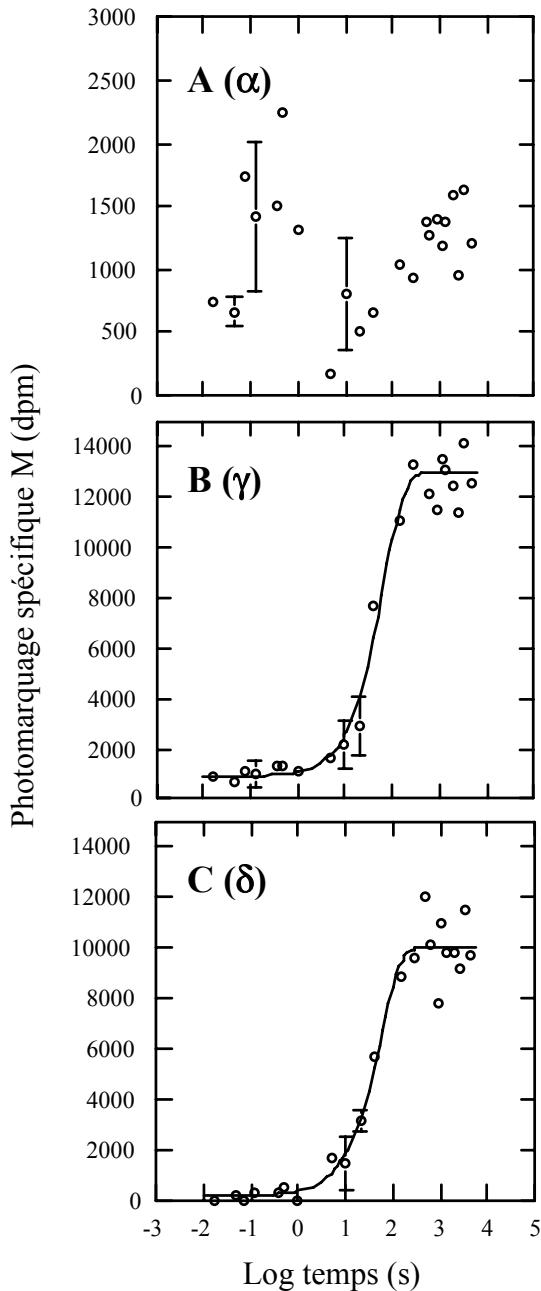


Figure 5-4: photomarquage spécifique associé à chacune des sous-unités en fonction du temps de mélange entre le nAChR et $[^3\text{H}]\text{AC5}$. Les sites agonistes préincubés avec l'ACh pendant 450 ms sont mélangés à l'obscurité avec la sonde $[^3\text{H}]\text{AC5}$ (500 nM) pendant un temps compris entre 17 ms et 1h15 (axe des abscisses). Après irradiation, les échantillons sont récupérés, centrifugés, et les culots, repris dans le tampon de charge, sont soumis à une gel d'électrophorèse SDS-PAGE 10 %. La radioactivité spécifique incorporée dans les sous-unités α (A), γ (B) et δ (C) est calculée en soustrayant la radioactivité non-spécifique (en présence de 500 μM de CCh) à la radioactivité totale (en absence de CCh). Les symboles représentent les écart-types de 2 à 3 expériences ($n = 1$ à 3). L'incorporation spécifique sur les sous-unités γ et δ peut être analysée par une simple exponentielle:

$$M(t) = M_{\max} [1 - \exp(-k_{\text{app}} \cdot t)] + M_{\min}$$

où $M_{\max}$ et $M_{\min}$ représentent respectivement l'amplitude et le minimum du signal spécifique et k_{app} est la constante de vitesse de pseudo premier ordre: $k_{\text{app}} = (\ln 2)/t_{1/2}$. Les cinétiques observées se trouvent aux alentours de 40 secondes pour les sous-unités γ et δ .

II) Analyse du photomarquage résolu en temps

Nous avons exploré une gamme de temps de mélange étendue, comprise entre 17 ms (résolution temporelle du système) et 1h15, avec une seule concentration en [^3H]AC5 : 500 nM. L'incubation à l'obscurité, et à 10 °C, du récepteur avec [^3H]AC5 est réalisée soit dans l'appareil de mélange rapide (temps d'incubation < 1 min), soit dans un bain cryostaté (temps d'incubation $\geq$ 1min). La quantité de protéine investie est toujours la même quels que soient les temps d'incubation ; nous pouvons donc comparer qualitativement et quantitativement l'incorporation de [^3H]AC5 en fonction du temps de mélange.

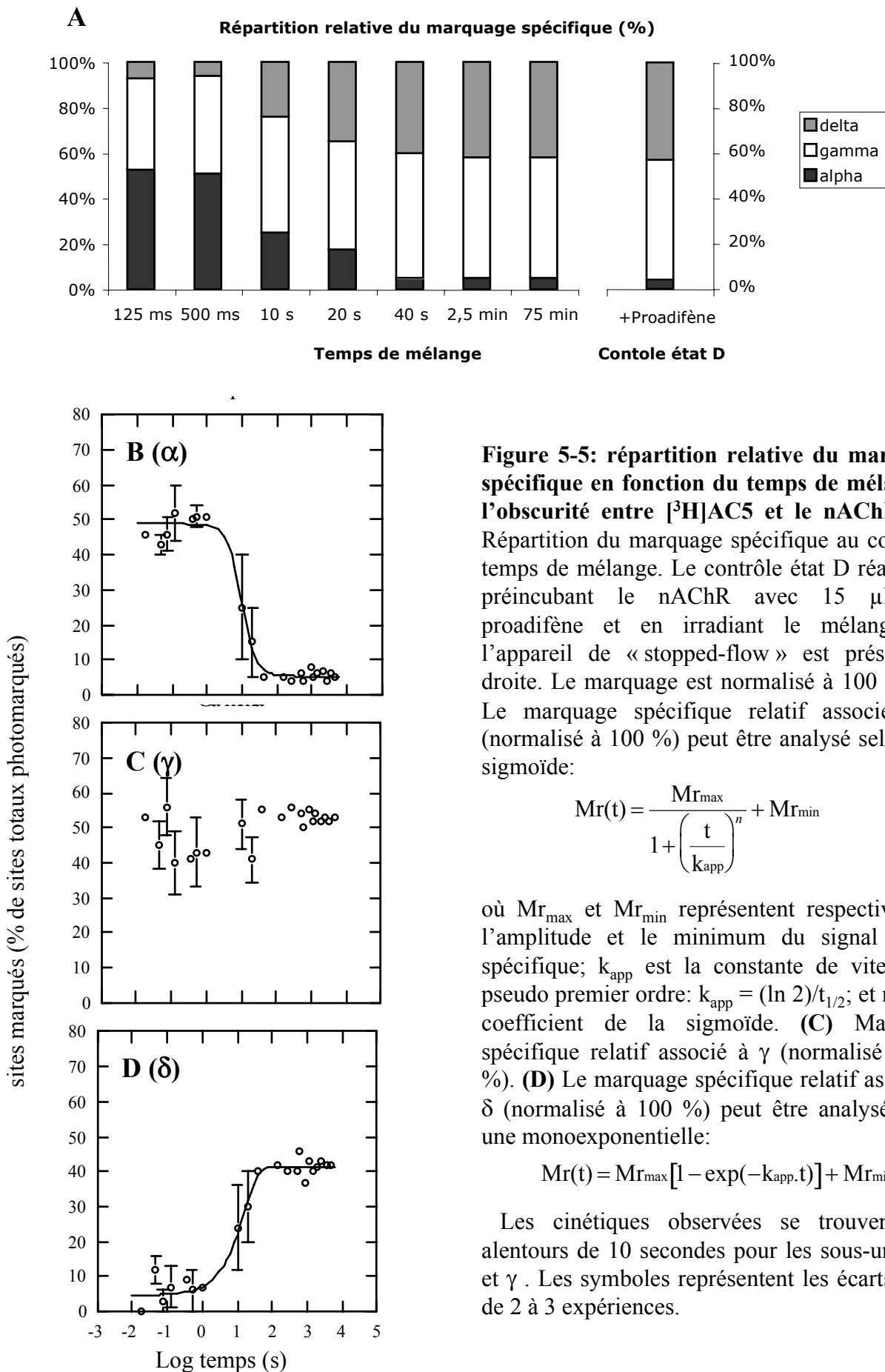
A) Evolution de la photoincorporation sur chaque sous-unité

Les profils d'incorporation spécifique de [^3H]AC5 (500 nM) au cours du temps sont présentés dans la **Figure 5-4**.

Le photomarquage spécifique associé à la sous-unité α ne semble pas suivre de comportement facilement descriptible par une simple équation (**Figure 5-4A**). Il est plus ou moins constant quels que soient les temps d'incubation. Néanmoins, étant donnés les écart-types considérables, dûs notamment aux faibles rendements d'incorporation sur α (< 0,2 % de sous-unité α alkylée quels que soient les temps d'incubation), nous préférons ne pas pousser plus loin l'analyse qualitative au niveau de cette sous-unité.

Le photomarquage spécifique associé aux sous-unités γ et δ peut être analysé selon une simple exponentielle (voir **Figure 5-4B** et **C**), dont les $t_{1/2}$ sont de 37 ± 9 et 45 ± 8 secondes respectivement ($k_{app} = 0,018$ et $0,05 \text{ s}^{-1}$ respectivement), dont les amplitudes (M_{max}) sont de $12\,050 \pm 480$ et 9850 ± 160 dpm respectivement, et dont les marquages minimum (M_{min}) sont de 890 ± 670 et 160 ± 310 dpm. Ces amplitudes correspondent à des taux de marquage spécifique des sites $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$ de 6,0 et 4,9 % respectivement, alors que les marquages minimum correspondent à des taux de marquage spécifique des sites $\alpha\gamma$ et $\alpha\delta$ de 0,4 et 0,08 % respectivement.

Entre 1 et 300 s, il y a donc une augmentation importante du taux de photomarquage (environ 15 fois plus de sites alkylés) qui se répartit sur la sous-unité γ (~ 15 fois) et sur la sous-unité δ (~ 60 fois), sans changement significatif au niveau de la sous-unité



α . Les taux de marquage obtenus pour des temps d'incubation supérieurs à 300 s sont notamment très proches de ceux obtenus lors du marquage du nAChR à l'équilibre en présence de proadifène (voir Chapitre IV).

Afin de pouvoir comparer directement les profils de photomarquage du nAChR à des temps d'incubation supérieurs à 300 secondes avec le profil de photomarquage du récepteur désensibilisé par le proadifène, il convient d'effectuer les irradiations dans les mêmes conditions. Nous avons donc préincubé le nAChR 45 min avec le BNC proadifène (15 μ M), puis la sonde [3 H]AC5 est ajoutée au milieu et ce mélange est chargé dans la seringue S3 de l'appareil de « stopped-flow ». L'irradiation est effectuée à une vitesse de 1 ml/s. Les taux de photomarquage obtenus en présence de proadifène ne sont pas significativement différents de ceux obtenus pour des temps d'incubation longs (données non montrées). Pour des temps de mélange entre la sonde et le nAChR supérieurs à 300 s, la grande majorité des récepteurs est donc vraisemblablement sous l'état désensibilisé D.

B) Répartition de la photoincorporation

La **Figure 5-5** illustre la répartition de la radioactivité entre les sous-unité α , γ et δ en fonction du temps de mélange. On appelle Mr le marquage spécifique relatif (exprimé en %) d'une sous-unité : $Mr_{tot} = Mr_{\alpha} + Mr_{\gamma} + Mr_{\delta} = 100 \%$ (la sous-unité β n'étant pas marquée).

Pour les temps de mélange inférieurs à la seconde, la radioactivité spécifique est incorporée principalement sur les sous-unités α ($Mr_{\alpha} = 43 - 52 \%$, soit 21 – 26 % sur chaque sous-unité α) et γ ($Mr_{\gamma} = 43 - 56 \%$), ainsi que minoritairement sur la sous-unité δ ($Mr_{\delta} = 0 - 12 \%$). Ce marquage est protégeable (30 – 70 %) par 500 μ M de CCh.

Pour des temps de mélange supérieurs à 300 s, la radioactivité spécifique est incorporée principalement sur les sous-unités γ ($Mr_{\gamma} = 50 - 56 \%$ du marquage spécifique, 80 – 90 % de protection par 500 μ M de CCh) et δ ($Mr_{\delta} = 37 - 46 \%$ du marquage spécifique, 80 – 90 % de protection par 500 μ M de CCh), ainsi que minoritairement sur la sous-unité α ($Mr_{\alpha} = 3 - 8 \%$ du marquage spécifique, 30 – 50 % de protection par 500 μ M de CCh).

Pour des temps de mélange intermédiaires (1–300 s), on a une diminution progressive du marquage spécifique relatif associé à α (Mr_{α}) concomitante à une augmentation progressive du marquage spécifique relatif associé à δ (Mr_{δ}). Ces deux phénomènes peuvent être analysés selon une équation sigmoïdale (voir **Figure 5-5**) dont le

temps de demi-vie est d'environ 10 s ($k_{app} = 0,07 \text{ s}^{-1}$). Le marquage spécifique relatif associé à la sous-unité γ est quasiment constant au cours du temps ($Mr_{\gamma} = 43 - 56 \%$).

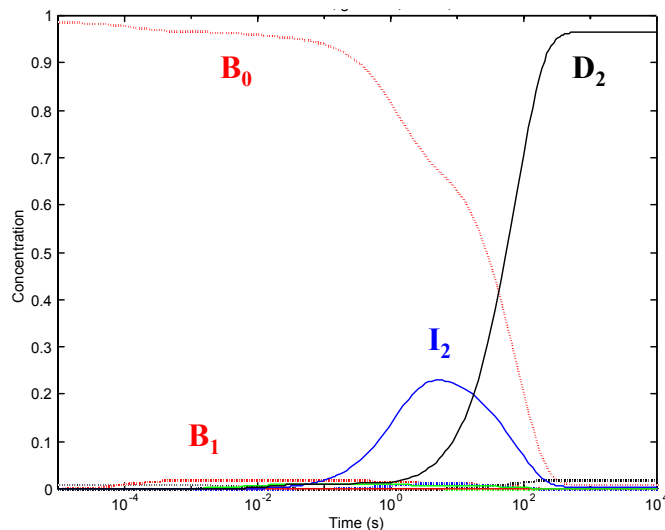
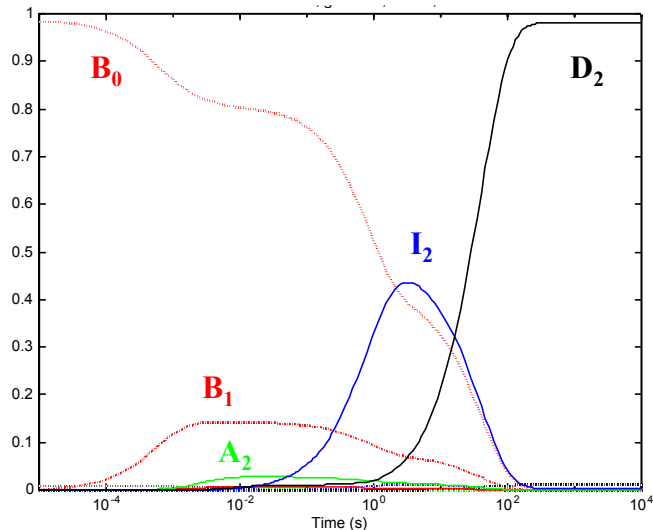
La répartition du photomarquage réalisé en préincubant les membranes avec 15 μM de proadifène est représentée en **Figure 5-5A**. La radioactivité est répartie entre les sous-unités α , γ et δ dans un rapport 4 / 53 / 43, rapport très proche de celui observé pour des temps de mélange longs ($> 300 \text{ s}$).

C) Limites de la technique

Un taux d'incertitude assez important est observé pour chaque point expérimental, notamment pour les temps inférieurs à 100 s. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer cette variabilité :

- le taux de photocouplage est très faible pour les temps très courts ($< 0,5 \%$ pour $t < 1 \text{ s}$).
- de petites différences qualitatives sont observées d'une préparation de membrane à l'autre.
- l'activité spécifique de la sonde [^3H]AC5 varie légèrement d'une synthèse radioactive à l'autre.
- Le mélange est réalisé entre une phase homogène (la sonde) et une phase hétérogène (les membranes) au niveau de la chambre de mélange M2 (**Figure 5-1**). Pour des temps de mélange très courts notamment, la viscosité du milieu peut perturber le mélange.
- La résolution temporelle du système (temps d'irradiation) est proche des temps les plus courts étudiés.

Malgré ces nombreuses incertitudes, le phénomène moléculaire que nous observons grâce à [^3H]AC5 semble suffisamment conséquent pour que nous tentions de comprendre les réorganisations structurales du nAChR de torpille au cours de la désensibilisation provoquée par cet agoniste photosensible. En effet, étant donné que les conditions d'irradiation sont identiques quels que soient les temps de mélange, les rendements de photoactivation de [^3H]AC5 doivent aussi être identiques. Par conséquent, les modulations de radioactivité observées reflètent vraisemblablement des transitions conformationnelles du récepteur.

A**B**

	Etat B	Etat A	Etat I	Etat D
$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$
$k_{off} (s^{-1})$	7500	5	2	0, 8
Kd (M)	$50 \cdot 10^{-6}$	$33 \cdot 10^{-9}$	$13 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
Kd Ratio	$^{BA}_c = 67 \cdot 10^{-4}$	$^{AI}_c = 04$	$^{ID}_c = 04$	

	Etat B	Etat A	Etat I	Etat D
$k_{on} (M^{-1}s^{-1})$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$	$1, 5 \cdot 10^8$
$k_{off} (s^{-1})$	1500	5	2	0, 8
Kd (M)	$10 \cdot 10^{-6}$	$33 \cdot 10^{-9}$	$13 \cdot 10^{-9}$	$5 \cdot 10^{-9}$
Kd Ratio	$^{BA}_c = 33 \cdot 10^{-3}$	$^{AI}_c = 04$	$^{ID}_c = 04$	

Paramètres indépendants	Probabilité d'interconversion	B ↔ A	A ↔ I	I ↔ D
		$^{BA}_p = 0, 2$	$^{AI}_p = 0, 2$	$^{ID}_p = 0, 2$
Paramètres déduits	Vitesses d'interconversion (s ⁻¹)	$^{BA}_{k_0} = 0, 4$	$^{AI}_{k_0} = 19, 7$	$^{ID}_{k_0} = 0, 6$
		$^{AB}_{k_0} = 1, 0 \cdot 10^4$	$^{IA}_{k_0} = 3, 4$	$^{DI}_{k_0} = 1, 2 \cdot 10^{-3}$
Paramètres déduits	Vitesses d'interconversion (s ⁻¹)	$^{BA}_{k_2} = 6, 5 \cdot 10^4$	$^{AI}_{k_2} = 20, 1$	$^{ID}_{k_2} = 0, 61$
		$^{AB}_{k_2} = 579$	$^{IA}_{k_2} = 0, 69$	$^{DI}_{k_2} = 1, 0 \cdot 10^{-4}$
Paramètres déduits	Constantes allostériques	$^{BA}_{L_0} = 2, 0^4$	$^{AI}_{L_0} = 0, 9$	$^{ID}_{L_0} = 2, 5 \cdot 10^{-2}$
		$^{BA}_{L_2} = 8, 9 \cdot 10^{-3}$	$^{AI}_{L_2} = 0, 6$	$^{ID}_{L_2} = 3, 8 \cdot 10^{-3}$

Paramètres indépendants	Probabilité d'interconversion	B ↔ A	A ↔ I	I ↔ D
		$^{BA}_p = 0, 2$	$^{AI}_p = 0, 2$	$^{ID}_p = 0, 2$
Paramètres déduits	Vitesses d'interconversion (s ⁻¹)	$^{BA}_{k_0} = 0, 4$	$^{AI}_{k_0} = 19, 7$	$^{ID}_{k_0} = 0, 6$
		$^{AB}_{k_0} = 1, 0 \cdot 10^4$	$^{IA}_{k_0} = 3, 4$	$^{DI}_{k_0} = 1, 2 \cdot 10^{-3}$
Paramètres déduits	Vitesses d'interconversion (s ⁻¹)	$^{BA}_{k_2} = 5 \cdot 10^3$	$^{AI}_{k_2} = 20, 1$	$^{ID}_{k_2} = 0, 61$
		$^{AB}_{k_2} = 1103$	$^{IA}_{k_2} = 0, 69$	$^{DI}_{k_2} = 1, 0 \cdot 10^{-4}$
Paramètres déduits	Constantes allostériques	$^{BA}_{L_0} = 2, 0^4$	$^{AI}_{L_0} = 0, 9$	$^{ID}_{L_0} = 2, 5 \cdot 10^{-2}$
		$^{BA}_{L_2} = 0, 2$	$^{AI}_{L_2} = 0, 6$	$^{ID}_{L_2} = 3, 8 \cdot 10^{-3}$

Figure 5-6: Simulation STOIC des populations d'états pour une concentration en AC5 de 500 nM. Evolution des différents états (B, rouge; A, vert; I, bleu; et D, noir) stabilisés soit sans AC5 (pointillés), soit par une (tirets) ou deux (traits pleins) molécules d'AC5. Les deux sites agonistes sont considérés comme équivalents entre eux, quel que soit l'état du récepteur. L'affinité d'AC5 pour les sites ACh à l'état de repos B est estimée soit à 50 μM (A), soit à 1 μM (B).

D) Modèle allostérique proposé

Pour des temps de mélange longs (> 300 s), les profils et les rendements de photomarquage spécifique sont constants et très proches de ceux obtenus en préincubant le nAChR avec $15 \mu\text{M}$ de proadifène. Le nAChR de torpille est donc fort probablement dans un état complètement désensibilisé D au delà de 300 s d'incubation avec la sonde [^3H]AC5.

Qu'en est-il pour des temps de mélange plus court ? Il est plus difficile de répondre à cette question, étant donné qu'on n'a pas le moyen de mesurer simultanément le courant et la liaison. STOIC est un programme fonctionnant sous MATLAB qui permet de visualiser graphiquement au cours du temps l'évolution des différentes populations d'états conformationnels pour une concentration fixe d'agoniste (Edelstein et al., 1996). Toutes les populations d'état (B^{21} , A, I et D) non ligandés, monoligandés et biligandés sont représentés en fonction du temps.

Nous avons utilisé STOIC pour simuler les transitions allostériques du nAChR de torpille suite à une application de 500 nM d'AC5. Nous avons utilisé les constantes d'isomérisation du récepteur, indépendantes du ligand, et décrites dans la littérature (Heidmann & Changeux, 1979; Boyd & Cohen, 1980; Edelstein et al., 1996; Raines & Krishnan, 1998). Pour les paramètres de liaison du ligand, nous connaissons uniquement la constante d'équilibre de [^3H]AC5 sous l'état D ($K_d = 5 \text{ nM}$). Les constantes de vitesse d'association sont considérées être proches des limites de diffusion ($1,5 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Edelstein et al., 1996). Les constantes de vitesse de dissociation sont estimées d'après la littérature : celle de l'ACh pour l'état B ($^Bk_{\text{on}}$) se situe entre 1500 et 8000 s^{-1} par exemple (Edelstein et al., 1996; Raines & Krishnan, 1998), soit un K_d de l'ACh pour l'état de repos entre 1 et $50 \mu\text{M}$. Les constantes de vitesse de dissociation pour les états A et I sont ensuite ajustées en fonction des résultats expérimentaux de photomarquage.

La **Figure 5-6** présente deux simulations effectuées avec les valeurs extrêmes pour $^Bk_{\text{on}}$ (1500 et 7500 s^{-1}). Ces deux simulations attribuent aux états A et I des affinités (33 et 13 nM) proches de celle pour l'état D. Elles sont assez représentatives de la cinétique d'incorporation de la sonde [^3H]AC5 sur le récepteur qui se situe autour de la dizaine de

²¹ L'état B (pour Basal) est l'état de repos du récepteur. Il n'est pas noté R dans le programme STOIC afin d'éviter toute confusion avec l'état relâché de haute affinité R dans la formulation originale de l'allostérie selon (Monod et al., 1965).

secondes. En effet, pour des temps de mélange supérieurs à 300 s, environ 95 à 100 % des récepteurs sont sous l'état D (trace noire). Le temps de demi-vie de ce processus d'isomérisation vers l'état D est similaire à celui que l'on observe au niveau du marquage. Pour les temps de mélange inférieurs à 100 s, on a un mélange d'états (B_1 , I_2 et D_2) dont la proportion relative dépend énormément de la valeur que l'on attribue à $^Bk_{on}$. Pour des valeurs de $^Bk_{on}$ élevées (donc un BK_d élevé), l'état basal de faible affinité n'est jamais peuplé (**Figure 5-6A**). Le marquage que l'on observe pour des temps de mélange courts serait donc plutôt un attribué à l'état I. Pour des valeurs de $^Bk_{on}$ faibles (donc un BK_d faible), on peuple rapidement cet état B, d'affinité modérée, avec une molécule de sonde (**Figure 5-6B**, tracé en tirets rouge). Le marquage que l'on observe pour des temps de mélange courts serait donc plutôt un reflet d'un mélange d'états B et I.

Trop de données expérimentales concernant AC5 manquent cependant (notamment en électrophysiologie) pour pouvoir accorder à cette simulation un quelconque crédit. Il serait notamment crucial de voir si AC5 est un agoniste entier ou partiel du nAChR de torpille. Un agoniste nicotinique peut être partiel soit parce que le rapport des affinités ^{BA}c est trop grand (ce qui se traduit par une constante allostérique $^{BA}L_2$ élevée, et donc une probabilité d'ouverture pour un récepteur diligandé faible), soit parce qu'il inhibe le récepteur de manière stérique en allant se lier au site canal. Il a été montré par mesures de courant sur canaux unitaires que AC5 inhibe de manière stérique le nAChR musculaire (Chatrenet et al., 1992). AC5 est donc certainement un agoniste partiel du nAChR de torpille, du fait de son caractère mixte agoniste/BNC, mais nous ne connaissons pas la valeur de sa constante d'isomérisation $^{BA}L_2$ (valeur accessible par mesure électrophysiologiques). Il est effectivement possible que la liaison de deux molécules d'AC5 sur le nAChR provoque, de la même manière que pour l'ACh, l'isomérisation de la majorité des récepteurs vers l'état actif. La simulation réalisée ici attribue à $^{BA}L_2$ une valeur de $8,9 \cdot 10^{-3}$, c'est-à-dire une probabilité d'ouverture supérieure à 99 % pour un récepteur biligandé.

La modélisation STOIC ne nous a donc pas permis de connaître l'état structural du nAChR majoritairement marqué par $[^3H]AC5$ pour des temps de mélange courts ; cet état transitoire est certainement un mélange d'états B, I et D, l'état A n'étant pas suffisamment peuplé avec cette faible concentration d'agoniste (500 nM). L'augmentation de photomarquage que l'on observe aux alentours de 40 s reflète donc probablement la transition d'un mélange d'états B (ou R) et I vers l'état D.

Etant donnée la très grande analogie structurale entre AC5 et l'agoniste partiel fluorescent Dns-C₆-Ch (voir **Figure 2-36**), il paraît essentiel de comparer nos résultats à ceux obtenus précédemment par spectroscopie de fluorescence. Les équilibres conformationnels du nAChR de torpille ont été étudiés avec de larges gammes de concentration en Dns-C₆-Ch : de 100 nM à 1 mM (Heidmann & Changeux, 1979; Heidmann & Changeux, 1980; Heidmann et al., 1983). Ces expériences ont permis de mettre en évidence trois états structuraux du récepteur: un état de basse affinité (~ 50 µM) qui est rapidement (dizaine à centaine de ms) converti en état d'affinité intermédiaire (~ 1 µM), puis plus lentement (seconde, minute) en état de haute affinité (~ 3 nM). Pour des concentrations submicromolaires en Dns-C₆-Ch, la transition intermédiaire n'est pas observée : les nAChRs sont directement conduits dans l'état D, sans peuplement significatif de l'état I (Heidmann et al., 1983).

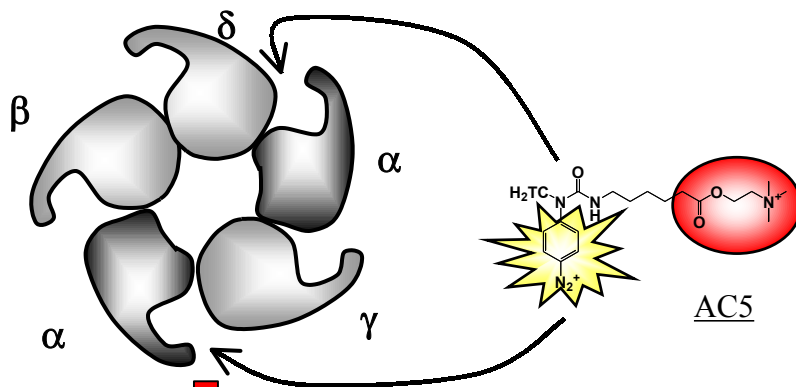
De la même manière, nous n'observons pas avec [³H]AC5 de transition rapide aux alentours de la dizaine à centaine de ms. La concentration submicromolaire de [³H]AC5 (500 nM) n'est donc peut-être pas suffisante, comme c'est le cas pour la Dns-C₆-Ch, pour observer la transition A → I. Cependant, il faut noter que cette transition rapide se situe dans une zone de temps où nous avons un rapport signal sur bruit assez faible ; il est possible que la résolution de notre système ne soit pas suffisante pour mettre en évidence un tel phénomène.

La seule transition que nous observons de manière non-ambiguë est celle qui se situe aux alentours de 40 s, de manière concomitante sur la sous-unité γ et δ (**Figure 5-4**). Une transition similaire est observée aux alentours de 30 secondes avec 500 nM de Dns-C₆-Ch (Heidmann & Changeux, 1979). Ce processus lent correspond à l'équilibration des nAChRs dans l'état désensibilisé de haute affinité. L'augmentation de fluorescence observée avec la Dns-C₆-Ch serait donc le reflet d'un rapprochement de la fonction dansyl des sous-unités complémentaires γ et δ.

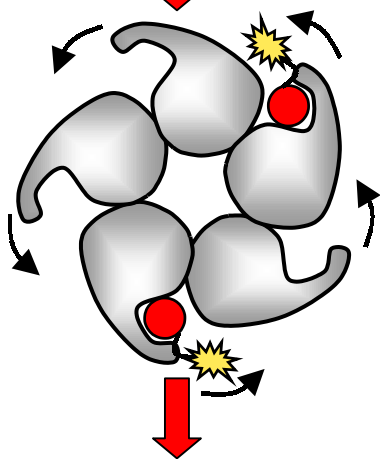
Au cours de cette transition structurale de l'état de moyenne affinité R et/ou I vers l'état de haute affinité D, on observe donc :

- une augmentation (environ 15 fois) du nombre de sites photomarqués de manière spécifique par [³H]AC5. Cette augmentation du rendement de photomarquage peut être associée à une augmentation de l'affinité de la sonde (donc une augmentation du taux d'occupation des sites agonistes), mais également à un meilleur rendement de photocouplage par site occupé. En effet, si le site agoniste est plus fermé par exemple, le degré de liberté de la sonde sera moindre, et la fonction aryldiazonium sera entourée d'un nombre de molécules d'eau plus

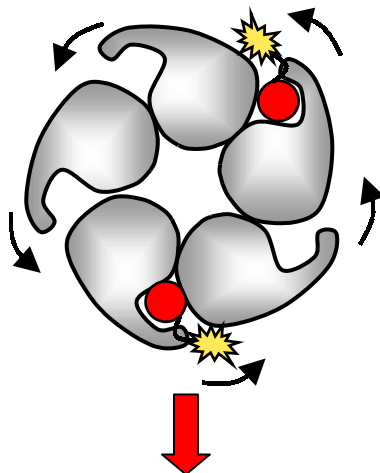
Etat R
Asymétrique
Sous-unités α tendues



Etat A
Symétrique
Sous-unités α relâchées



Etat I
Symétrique



Etat D
Symétrique

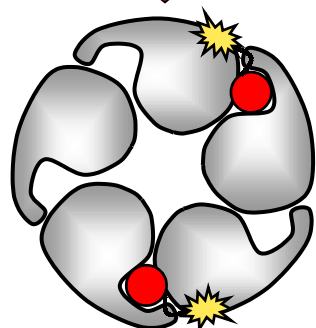


Figure 5-7: Modèle proposé pour la transition allostérique du domaine N-terminal extracellulaire du nAChR, de l'état R à l'état D.

faible. Le « quenching » par les molécules d'eau sera donc minimisé et la photoincorporation meilleure.

- Une évolution de la répartition de la radioactivité, allant d'un marquage prédominant des sous-unités α et γ pour les temps de mélanges courts, jusqu'à un marquage prédominant des sous-unités γ et δ pour le nAChR désensibilisé. Là encore, cette évolution de l'incorporation de [^3H]AC5 peut s'expliquer par une fermeture des sites agonistes, qui rapproche la fonction aryldiazonium des sous-unités complémentaires γ et δ .

La **Figure 5-7** illustre un modèle de réorganisations structurales du nAChR (domaine N-terminal extracellulaire) au cours de la désensibilisation. Ce modèle prends en compte nos résultats de photomarquage résolu en temps, mais également les connaissances acquises par d'autres méthodes sur la dynamique structurale du nAChR. Le récepteur sous l'état de repos serait dans une conformation asymétrique : les sous-unités α dans une conformation tendue et les autres sous-unités dans une conformation relâchée (Unwin, 1995; Unwin et al., 2002). La liaison de deux molécules d'agoniste sur les sous-unités α entraîne un changement de structure tertiaire de ces sous-unités α : rotation de 15-16° de la partie interne du sandwich β (Unwin et al., 2002) et mouvement concerté des boucles B et C du site agoniste notamment (Grutter et al., 2003). Ce changement de conformation des sous-unités α aboutit à un récepteur plus symétrique sous l'état A (même conformation pour les cinq sous-unités), mais également à un site agoniste plus étroit. L'affinité pour les agonistes passe notamment d'une très faible affinité pour l'état de repos (1 – 50 μM) à une affinité 1000 à 5000 fois supérieure pour l'état actif (Heidmann & Changeux, 1979; Edelstein et al., 1996; Grosman & Auerbach, 2001). Seules deux sous-unités sur cinq participeraient à l'activation du nAChR, ce qui explique peut-être la rapidité d'ouverture du canal (30 000 s^{-1}) ; cette rotation agirait comme un interrupteur au niveau du canal. En présence continue d'agoniste, le récepteur va ensuite se désensibiliser. Ce phénomène est beaucoup plus lent (de l'ordre de la s – min) que l'ouverture/fermeture du canal, et nécessiterait plutôt la contribution des cinq sous-unités (énergie d'activation assez élevée), c'est à dire une réorganisation quaternaire du nAChR. L'augmentation concomitante de l'incorporation de [^3H]AC5 au niveau des sous-unités γ et δ (valeurs de k_{app} pas significativement différentes) nous permet de proposer une rotation concertée des cinq sous-unités (modèle MWC) dans le sens inverse des aiguilles d'une montre. Cette rotation conduirait à un site agoniste plus étroit, donc à une meilleure

affinité des agonistes, mais également à une augmentation de la contribution des sous-unités non- α (Grutter et al., 2002).

Les différentes sous-unités du nAChR ne jouent donc pas forcément un rôle identique tout au long du processus d'activation et désensibilisation du nAChR. Les sous-unités α suffiraient à activer le récepteur, ce qui est une manière efficace d'ouvrir le canal en minimisant le nombre de molécules d'agoniste liées, alors que les cinq sous-unités seraient mises à contribution pour la désensibilisation. La différence significative de radioactivité associée, pour des temps de mélange courts comme pour des temps de mélange longs, à la sous-unité γ par rapport à la sous-unité δ peut s'expliquer par la différence pharmacologique des deux sites. Une hypothèse serait, on l'a vu, que le site $\alpha\gamma$ soit plus étroit que le site $\alpha\delta$, et ceci quel que soit l'état du récepteur. Il serait très intéressant de comprendre l'intérêt pour le nAChR musculaire de posséder ces deux sites pharmacologiquement différents.

En considérant une architecture consensuelle des récepteurs canaux à boucle cystéine, il est fort probable qu'un mécanisme commun soit à la base de l'activation et de la désensibilisation de ces récepteurs.

III) Conclusion

Nous avons analysé l'incorporation de l'agoniste photosensible [^3H]AC5 (500 nM) sur le nAChR, après photolyse flash du système, en fonction du temps de mélange à l'obscurité. A cet effet nous disposons d'un appareil de mélange rapide couplé à un système d'irradiation. Cette méthodologie nous a permis d'accéder à un état fugace du récepteur (ou un mélange d'états R et I) et à l'état thermodynamiquement stable D. L'analyse comparative du photomarquage nous a permis de montrer que le processus de désensibilisation lente (ordre de la min) rapprochait la fonction aryldiazonium d'AC5 des sous-unités complémentaires γ et δ , en accord avec un site plus étroit et une affinité plus grande des agonistes. Cette transition allostérique du nAChR se traduirait au niveau moléculaire par une réorganisation quaternaire du nAChR, associée à une rotation concertée des cinq sous-unités, en accord avec le modèle allostérique MWC.

Il n'a malheureusement pas été possible d'atteindre l'état actif très fugace. La concentration de [^3H]AC5 utilisée (500 nM) n'est en effet pas suffisante dans notre cas pour

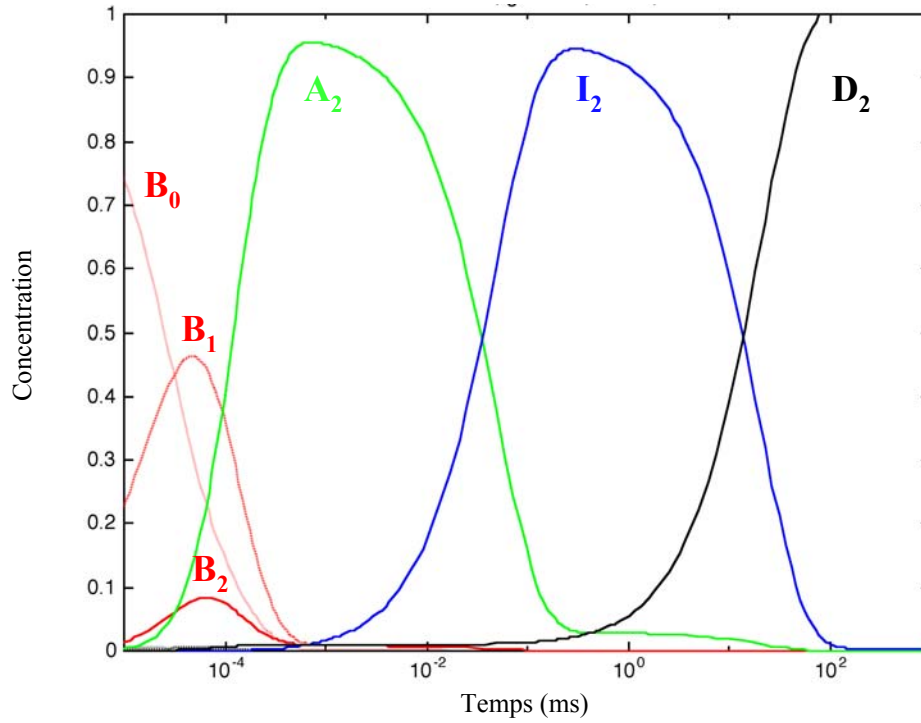


Figure 5-8: Simulation STOIC des populations d'état pour une concentration en AC5 de 100 μM . Les paramètres de k_{off} sont identiques à ceux décrits en Figure 5-6A. Les différents états sont indiqués.

activer le nAChR. Par manque de temps, il ne nous a pas été possible d'étudier les profils d'incorporation de la sonde en fonction de sa concentration. La simulation STOIC présentée en **Figure 5-8** pour une concentration en sonde de 100 μ M nous montre que pour un temps de 10 ms (la résolution temporelle de notre système), on a accès à un nAChR dans un état principalement actif ($\sim 70\%$), mais également à un état intermédiaire ($\sim 30\%$). Dans ces conditions, il serait théoriquement possible d'avoir une information de la zone accessible à la sonde AC5 sous l'état actif du récepteur. En pratique, il sera par contre très difficile d'analyser ce photomarquage car d'une part nous nous trouvons dans les limites de résolution du système, mais surtout la sonde AC5 possède un caractère BNC qui risque fort de compliquer les analyses. Le marquage résulterait d'une incorporation de la sonde dans les sites agonistes mais aussi dans le site canal. La concentration de CCh ou d'ACh nécessaire pour protéger le site agoniste conduirait sûrement également à une protection, même partielle, du site BNC. Il faudrait, pour protéger le marquage dans le site BNC, posséder un bloquant du canal ouvert qui ne perturbe pas les transitions allostériques du nAChR... Il paraît donc impossible de photographier l'état A du récepteur avec cette technique.

L'état de repos R est lui aussi très fugace lorsque le ligand est un agoniste. Afin de « photographier » l'état R avec la sonde AC5, il faudrait incuber le récepteur avec un ligand qui stabilise l'état de repos sans interférer avec la liaison d'AC5. Le BNC tétracaine pourrait nous aider dans cette étude (Boyd & Cohen, 1984), mais la mise en œuvre d'une telle expérience semble assez aventureuse. Il a également été montré que le nAChR pouvait être figé dans l'état de repos à l'aide d'agents de pontage tel le glutardialdéhyde (Watty et al., 1997). Cet agent chimique permet effectivement d'établir des liens covalents entre les différentes sous-unités, et d'inhiber ainsi tout remaniement de la structure tertiaire ou quaternaire du récepteur. Il serait alors possible d'effectuer un photomarquage des nAChRs avec [3 H]AC5 majoritairement sous l'état R. La difficulté majeure résiderait ensuite à couper ces liaisons covalentes afin de pouvoir déterminer les profils de photomarquage sur gel SDS-PAGE. Il serait ainsi avantageux d'utiliser un agent de pontage possédant une fonction labile (chimique ou éventuellement photochimique).

On pourrait aussi imaginer utiliser la sonde photosensible AC5 pour d'autres buts que d'établir une étude structurale ou dynamique du nAChR. Des agonistes photosensibles analogues de cGMP ont été utilisés sur les récepteurs canaux tétramériques CNG afin d'étudier les probabilités d'ouverture du canal en fonction du taux d'occupation des sites (Ruiz & Karpen, 1997). Les ligands covalamment attachés au site agoniste pouvaient

conduire, selon le taux d'occupation des sites, à une activation irréversible du récepteur. La molécule AC5 semble idéale afin de transposer cette méthode au nAChR. Il serait possible dans un premier temps de vérifier la présence de nAChRs constitutivement actifs après application d'AC5 et irradiation laser. Une protection sélective du site $\alpha\gamma$ du nAChR de torpille pourrait ensuite permettre de contrôler la liaison covalente de la molécule au niveau du site $\alpha\delta$. Il serait ainsi possible d'étudier les cinétiques d'ouverture du nAChR de torpille suite à une occupation du site $\alpha\delta$ et une application d'ACh.

IV) Partie Expérimentale

A) Généralités

Dispositif expérimental : L'appareil de mélange rapide (SFM-300, Biologic) modifié par insertion d'une électrovalve après la chambre d'irradiation est placé dans l'axe optique du faisceau polychromatique incident (lampe Xe/Hg, 1000 W, Osram, voir **Figure 5-1**). La température du système est maintenue à 10 °C, et toutes les expériences ont été effectuées dans le tampon C.

Tampon C: 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2, 100 mM NaCl, inhibiteurs de protéase Roche complete mini EDTA-free

B) Photolyse d'AC5

La sonde AC5 (65 μ M) est chargée dans la seringue S1. Les deux autres seringues sont chargées de tampon C (bien que S3 ne soit pas utilisée dans cette expérience, il ne faut pas laisser de seringue vide). Les tirs sont réalisés en flux continu, à des vitesses de 1, 2 ou 4 ml/s. La sonde AC5 est diluée (1:1) dans la boucle de retard I avant d'être irradiée ou non dans la chambre d'irradiation.

C) Irradiation en cinétique rapide

L'ACh (1,2 μ M) ou, pour les expériences de protection, la CCh (500 μ M), les membranes riches en récepteurs (1 μ M de sites [125 I] α -BgTx) et [3 H]AC5 (1 μ M) sont chargés dans les seringues S1, S2 et S3, respectivement (volume total de chaque seringue = 10 ml). Chaque réactant est dilué dans le tampon C. Les vitesses de tir dans la boucle II sont ajustées, selon le type d'expérience, entre 1 et 2 ml/s. Un programme séquentiel permet de mélanger le contenu de S1 (100 μ l) et S2 (100 μ l) dans la boucle de retard I (dilution 1:1) pendant 450 ms sans vider S3. Comme le volume de la boucle I (entre M1 et M2, voir **Figure 5-1**) est fixé à 190 μ l, le mélange est réalisé en flux interrompu à une vitesse de 1 ml/s. Suite à la pré-incubation des sites avec 0,6 μ M d'ACh, et suivant le volume de la boucle de retard II utilisé (boucles de 17 μ l, 40 μ l, 90 μ l et 190 μ l), [3 H]AC5 (1 μ M) est mélangé, en flux continu ou interrompu suivant les boucles utilisées, avec le même volume (dilution 1:1) de récepteur

pré-saturé, pendant le temps désiré. Afin d'éviter des contaminations, au cours de la pré-saturation, entre les échantillons de la boucle I et [^3H]AC5 (S3), les premiers microlitres du [^3H]AC5 (20 μl) et du mélange dans la boucle I (40 μl) sont sacrifiés (non récupérés dans la seringue de collecte et dirigés vers un récipient de déchets). Après le passage des échantillons dans la chambre d'irradiation (FC-15, 31 μl), le récepteur alkylé est récupéré dans la seringue de collecte (200 μl). Aussi afin d'augmenter les volumes récupérés, chaque tir est répété 6 fois consécutives au cours d'une expérience. Au final, nous récupérons 1200 μl (+ 55 μl = volume contenu dans l'électrovalve) de récepteurs alkylés dans la seringue de collecte. Après chaque expérience, la boucle de retard II, la chambre d'irradiation ainsi que le volume de la boucle contenu dans l'électrovalve sont systématiquement rincés par du tampon pour éviter les contaminations avec les tirs suivants. Afin d'éviter que les membranes riches en récepteurs sédimentent dans les seringues, des mouvements « aller-retour » sont effectués à l'aide des pistons entre chaque tir.

A l'issue des irradiations, les échantillons sont centrifugés à 11000 g pendant 30 minutes à 4°C. Les culots sont repris dans le tampon de charge, agités 15 minutes à T.A., chauffés 15 minutes à 30 °C, puis sont soumis à un gel d'électrophorèse de polyacrylamide (8 %) en conditions dénaturantes. Après coloration et décoloration du gel, la radioactivité est quantifiée par découpage du gel en tranches régulières (voir la partie expérimentale du chapitre IV, p 108).

D) Irradiation en cinétique lente ou à l'équilibre

Pour les expériences dont les temps de mélange sont supérieurs à 1 minute, nous avons utilisé le protocole expérimental suivant : les membranes riches en récepteurs (0,325 μM de sites [^{125}I] α -BgTx) sont pré-incubées ou non avec 15 μM de proadifène pendant 45 minutes à 10 °C. Puis [^3H]AC5 (500 nM) est ajouté et incubé à l'obscurité à 10°C pendant le temps désiré (jusqu'à 1h15) sous agitation en absence ou en présence de 500 μM de CCh. Les échantillons sont chargés dans la seringue de collecte S3 (S1 et S2 ne sont pas utilisées) et irradiés dans la chambre d'irradiation (mode en flux continu à 1 ml/s). Les récepteurs alkylés sont récupérés comme décrit ci-dessus.

Chapitre 6 :

Photomarquage préparatif du nAChR désensibilisé (état D)

I)	Mise au point du photomarquage préparatif	130
	A) Stratégie utilisée	130
	B) Principe du MALDI-TOF	132
	C) Mise au point de la protéolyse « in gel » du nAChR de torpille	133
	D) Analyse MALDI-TOF du photomarquage par <u>AC5</u>	134
II)	Analyse du photomarquage préparatif par [³H]AC5	136
	A) Extraction des peptides	136
	B) Première purification CLHP des peptides	137
	C) Seconde purification CLHP des peptides	138
III)	Conclusion	142
IV)	Partie expérimentale	144
	A) Généralités	144
	B) Photomarquage préparatif par [³ H] <u>AC5</u>	145
	C) Photomarquage analytique par <u>AC5</u>	145
	D) Protéolyse « <i>in gel</i> » des sous-unités γ et δ par les protéases V8, EndoLys-C et Trypsine	145
	E) Purification CLHP des peptides	147
	F) MALDI-TOF	147
	G) Séquençage	148

La sonde [^3H]AC5 s'incorpore sur le nAChR de torpille avec une très grande spécificité lorsque celui-ci est sous l'état désensibilisé D. Les rendements de photomarquage sur les sous-unités γ et δ sont suffisants pour entreprendre un marquage préparatif en vue de l'identification des peptides et acides aminés marqués par la sonde sur ces deux sous-unités.

I) Mise au point du photomarquage préparatif

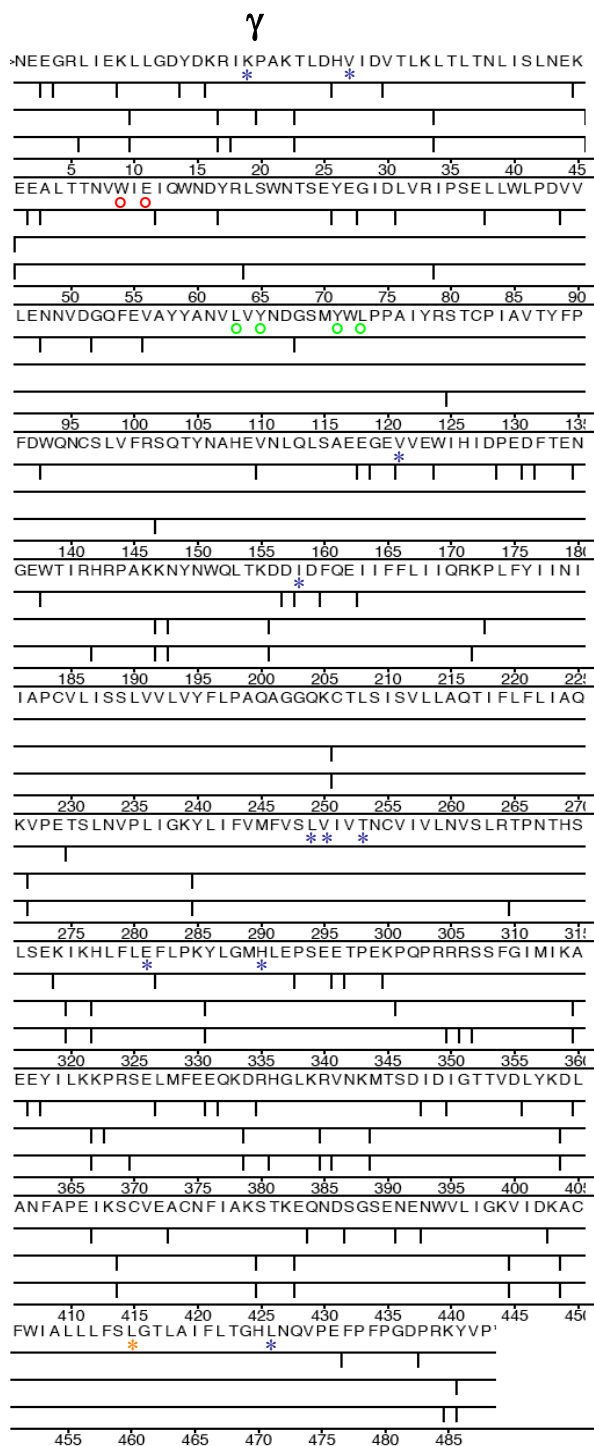
Afin d'identifier les résidus marqués par [^3H]AC5 sous l'état D du nAChR, il convient de photomarquer une grande quantité de récepteurs. En effet, tout au long des différentes étapes de purification (voir **Figure 3-2**), les rendements de récupération de matériel investi diminuent sensiblement. Le récepteur de torpille présente, à cet égard, une source de matériel inestimable.

A) Stratégie utilisée

Les sous-unités γ et δ sont de loin les sous-unités les plus marquées par [^3H]AC5 sous l'état D du nAChR de *Torpedo marmorata*. Nous avons donc choisi d'identifier les peptides et résidus alkylés uniquement sur ces deux sous-unités. Il nous faut donc élaborer une stratégie de protéolyse et d'analyse des peptides qui nous permette d'aller jusqu'au bout de notre étude. La stratégie de protéolyse se base sur les connaissances structurales du récepteur:

- séquence des sous-unités: au moment où nous avons entrepris cette étude, la sous-unité α était la seule sous-unité du nAChR de *Torpedo marmorata* à avoir été clonée. Nous ne connaissions donc pas les séquences des sous-unités β , γ et δ . Cependant, toutes les sous-unités du nAChR de *Torpedo californica* avaient été clonées. Ces deux espèces de torpille vivent dans des eaux différentes (océan Pacifique pour *T.californica*; côtes est de l'océan Atlantique et mer Méditerranée pour *T.marmorata*) mais leur génome doivent posséder une grande homologie. Afin d'estimer l'homologie de séquence inter-espèce entre les sous-unités γ et δ , nous avons calculé l'homologie de séquence au sein des sous-unités α du nAChR et des AChEs. Les alignements de séquence réalisés à l'aide de BLAST²² nous permettent de calculer des identités de séquences de 99 % (457 résidus identiques sur 461) et de 97 % (572/586) pour la sous-unité α du nAChR et pour l'AChE respectivement. Nous pouvions

²² BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) est un logiciel disponible sur l'internet (<http://www.expasy.org/tools/blast/>) qui permet de faire des alignements de séquences de protéine.



V8
EndoLys-C
Trypsine

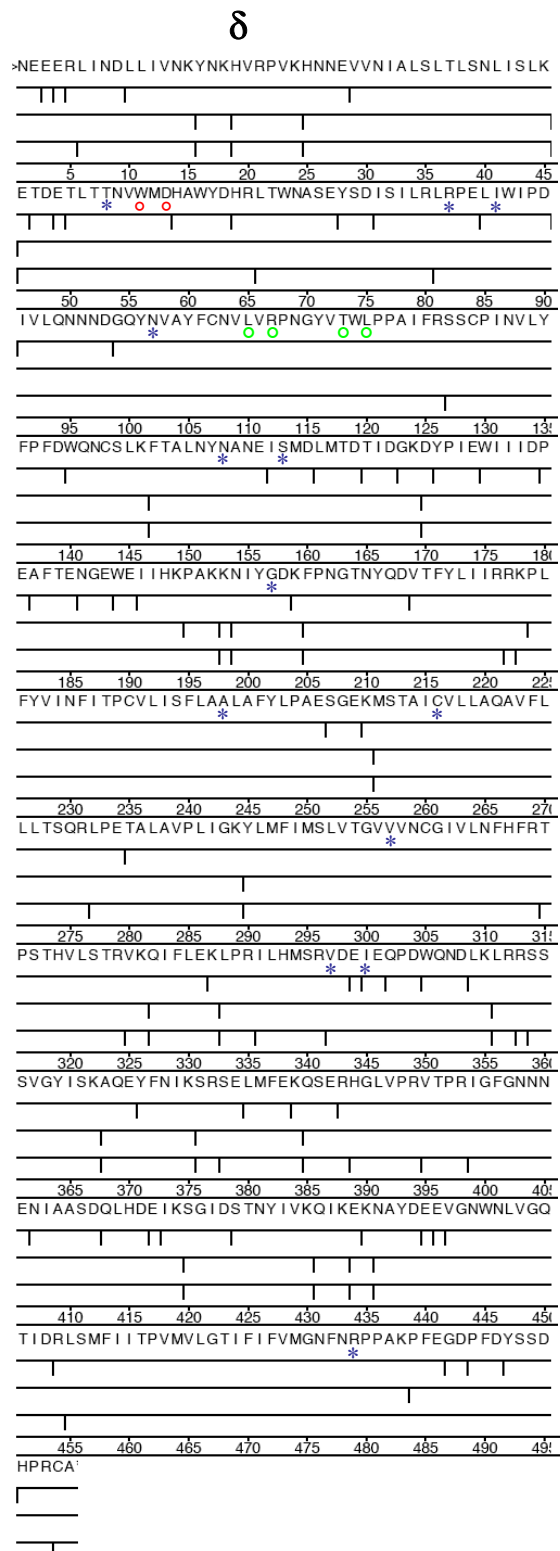


Figure 6-1: Simulation de protéolyse V8 (ligne du haut), EndoLys-C (ligne du milieu) et Trypsine (ligne du bas) des sous-unités γ (à gauche) et δ (à droite) du nAChR de *Torpedo marmorata*. Légende:

- acide aminé de la boucle D identifié par photomarquage
- acide aminé de la boucle E identifié par photomarquage
- * acide aminé de nature et de masse différentes chez *T.californica*
- * acide aminé de nature différente mais de masse identique chez *T.californica*.

donc espérer de très bonnes identités de séquences (> 95 %) entre les sous-unités γ et δ des deux espèces.

Les sous-unités β , γ et δ de *T.marmorata* ont été très récemment clonées: numéros de référence “AC” Q6S3I0, Q6S3H9 et Q6S3H8, respectivement (Tierney et al., 2004). Elles possèdent 96 % (474/496), 97 % (494/506) et 97 % (509/522) d'identité de séquence, respectivement, avec leur homologue *californica*. Bien que cette homologie de séquence soit très importante, le fait de ne pas connaître la structure primaire de la protéine au moment où on l'étudie complique, on le verra, la simulation de protéolyse ainsi que l'analyse par spectrométrie de masse et le séquençage.

- Modèle structural du nAChR de torpille: la structure à haute résolution de l'AChBP nous a permis de construire un modèle structural du domaine extracellulaire du nAChR de torpille (séquences de *T.californica*). Le docking d'AC5 dans ce modèle nous permet également d'avoir une idée sur la région topographiée par le groupement photosensible d'AC5 (du moins sous l'état conformationnel obtenu en cristallogénèse). Dans ce modèle, le groupement triméthylammonium se situe dans la cage aromatique du site agoniste, et le bras espaceur fait sortir le groupement aryldiazonium par la cavité supérieure du site (voir **Figure 4-3**). Le groupement aryldiazonium entrerait donc en contact principalement avec la boucle E du site agoniste. Cette boucle E a déjà été marquée par des antagonistes photosensibles dont la structure chimique est voisine de celle d'AC5 (Wang et al., 2000; Chiara et al., 2003).

Nous avons ainsi choisi d'utiliser la protéase qui a permis d'identifier les résidus marqués sur la boucle E par [³H]Bz₂Ch et [³H]TDBzCh: l'EndoGlu-C (protéase V8 de *S.aureus*). Cette enzyme coupe soit seulement après les acides glutamiques, soit après les acides glutamiques et aspartiques suivant les conditions expérimentales. La **Figure 6-1** représente une simulation de protéolyse des sous-unités γ et δ par trois enzymes que nous avons utilisées:

- la protéase V8 (dans les conditions où elle hydrolyse les liaisons peptidiques après Asp et Glu) qui coupe notamment juste avant la boucle E du site ACh. C'est l'enzyme que nous avons utilisée pour les photomarquages préparatifs.

- l'EndoLys-C qui coupe notamment juste avant la boucle D du site agoniste. Cette enzyme a permis d'identifier les résidus de la boucle D marqués par la [³H]nicotine et la [³H]dTC (Chiara & Cohen, 1997; Chiara et al., 1998).

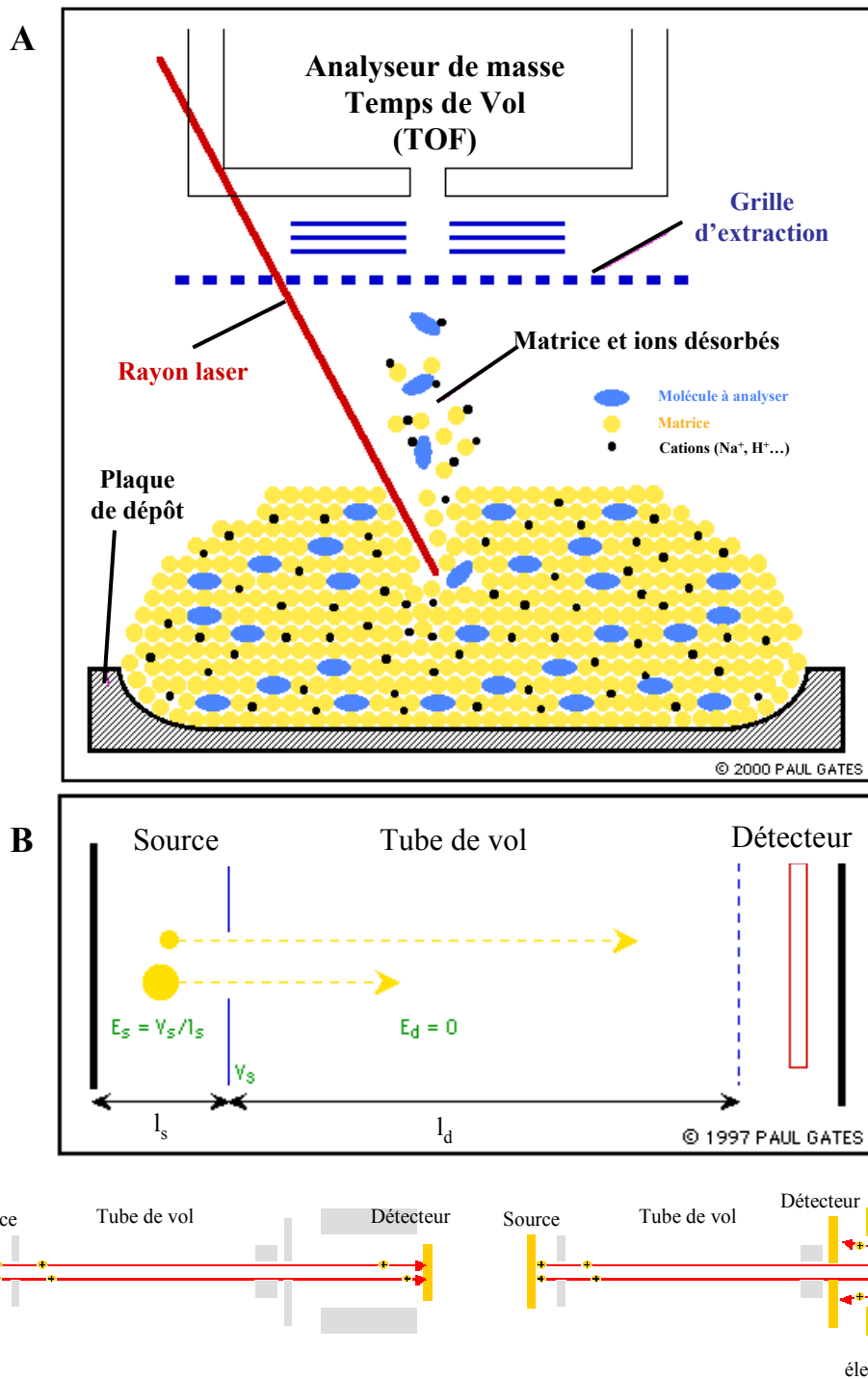


Figure 6-2: Schéma d'organisation du MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight). (A) Schéma de la chambre d'ionisation. Le laser désorbe la matrice, qui entraîne avec elle les molécules à analyser et leur transfert des ions. (B) Ces molécules ionisées sont alors transférées dans le tube de vol, à une vitesse qui est fonction de leur masse, jusqu'au détecteur. (C) Il existe deux types d'enregistrement: le mode linéaire (à gauche) pour des masses élevées (jusque 50 kDa) et une haute sensibilité; et le mode réflectron (à droite) pour les faibles masses (< 10 kDa) et une haute résolution.

- La trypsine qui coupe après les acides aminés basiques R et K et qui est couramment utilisée en protéomique.

A l'issue des différentes étapes de photomarquage, de protéolyse ou de purification CLHP, nous avons choisi d'analyser les peptides par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

B) Principe du MALDI-TOF

Le MALDI-TOF est un spectromètre de masse utilisé en protéomique dans lequel une **Matrice Assiste le Laser pour Désorber et Ioniser** l'échantillon afin de déterminer son Temps de Vol (ou **Time Of Flight**), donc de mesurer sa masse moléculaire.

Les molécules à analyser sont mélangées à une quantité importante de matrice qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé, ce qui a pour effet d'évaporer la matrice, entraînant avec elle l'échantillon en phase gazeuse (**Figure 6-2A**). Les molécules ionisées de la matrice transfèrent un ion (H^+ , Na^+ , K^+ ,... suivant la teneur en sels des échantillons) aux molécules de l'échantillon (moins de 10 ns après l'irradiation) dans la phase ainsi obtenue. Une fois que les ions sont formés, ils sont accélérés jusqu'à 20 keV grâce à une haute tension appliquée sur une grille et envoyés dans un tube de vol où ils volent jusqu'au détecteur. Le tube de vol est maintenu sous vide et, à partir du moment où les ions ont la même énergie, ceux qui ont une masse différente volent avec une vitesse différente. Ainsi les ions ayant une masse élevée voleront plus lentement que les ions ayant une masse plus faible (**Figure 6-2B**). Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée par un multiplicateur d'électrons et enregistrée (t_1). Le temps zéro (t_0) est le moment où le laser a tiré. Le temps de vol des différents ions est calculé de la façon suivante :

$$\frac{m_i}{z_i} = 2 \cdot e \cdot E \left(\frac{t_i}{l_d} \right)^2$$

avec : m_i la masse de la molécule à analyser ; z_i sa charge ; t_i le temps de vol ($= t_1 - t_0$) ; l_d la longueur de la chambre de vol ; l_s la longueur de la source, E le champ d'extraction ; et e la charge électronique.

Le laser ne permet pas de désorber des molécules de masse molaire importante. La désorption des grosses molécules est ainsi assistée par la matrice. Cette matrice doit donc posséder une grande absorbance à la longueur d'onde du laser, doit être de masse molaire faible, doit favoriser la séparation des molécules en réduisant les forces intermoléculaires et doit faciliter l'ionisation en induisant des transferts de protons. La matrice que nous utilisons

est l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique. Elle est classiquement utilisée pour les peptides et protéines. C'est également la matrice la plus tolérante aux sels.

Les analyses MALDI-TOF ont été réalisées dans le laboratoire de Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes, UPR 9022 CNRS, IBMC, Strasbourg, sous la direction de Laurence Sabatier.

C) Mise au point de la protéolyse « in gel » du nAChR de torpille

Le but de cette expérience était de vérifier si la protéolyse du nAChR de torpille par la protéase V8 était envisageable “in gel”. A notre connaissance, aucune protéolyse “in gel” n'avait été publiée dans la littérature avec cette enzyme, la trypsine étant plus couramment utilisée dans les études protéomiques. La trypsine (23,5 kDa) est de masse molaire plus faible que la protéase V8 (30 kDa); elle peut donc diffuser plus facilement dans les mailles du gel d'électrophorèse. Par ailleurs, les conditions dénaturantes du gel ne semblent pas affecter ses propriétés de protéolyse (Rosenfeld et al., 1992). Il convient donc de vérifier si une protéolyse “in gel” est applicable à la protéase V8. La protéolyse “in gel” présente en effet de nombreux avantages (pour revue voir (Michalski & Shiell, 1999)):

- Elle permet le clivage de la protéine au sein de la matrice de polyacrylamide, suivi de l'élution passive des peptides générés. Ceci permet de limiter le nombre d'étapes (et donc de minimiser les pertes successives), d'augmenter les rendements d'extraction (souvent très faibles pour des protéines, sauf par transfert sur membrane) et d'éviter les contaminations avec des agents non-protéiques.
- Elle évite les multiples étapes lourdes de purification, nécessaires mais peu avantageuses d'un point de vue pratique, notamment la précipitation des protéines par l'acétone pour éliminer le SDS.
- Elle est compatible avec les techniques de purification CLHP, de microséquençage et de spectrométrie de masse.

Après séparation des protéines contenues dans la préparation de membranes riches en nAChR (40 μ g, $\sim$ 100 pmoles de sites [125 I] α -BgTx) par mini-gel SDS-PAGE 10 %, les bandes correspondant aux sous-unités γ et δ du récepteur nicotinique sont excisées, puis chaque bande est émincée en plusieurs petits fragments de quelques mm³. Les bouts de gels sont lavés (pour éliminer les contaminants : colorant, acide, SDS...) et deshydratés, et les protéines sont ensuite réduites (DTT) et alkylées (iodoacétamide) « in gel », afin d'éviter une

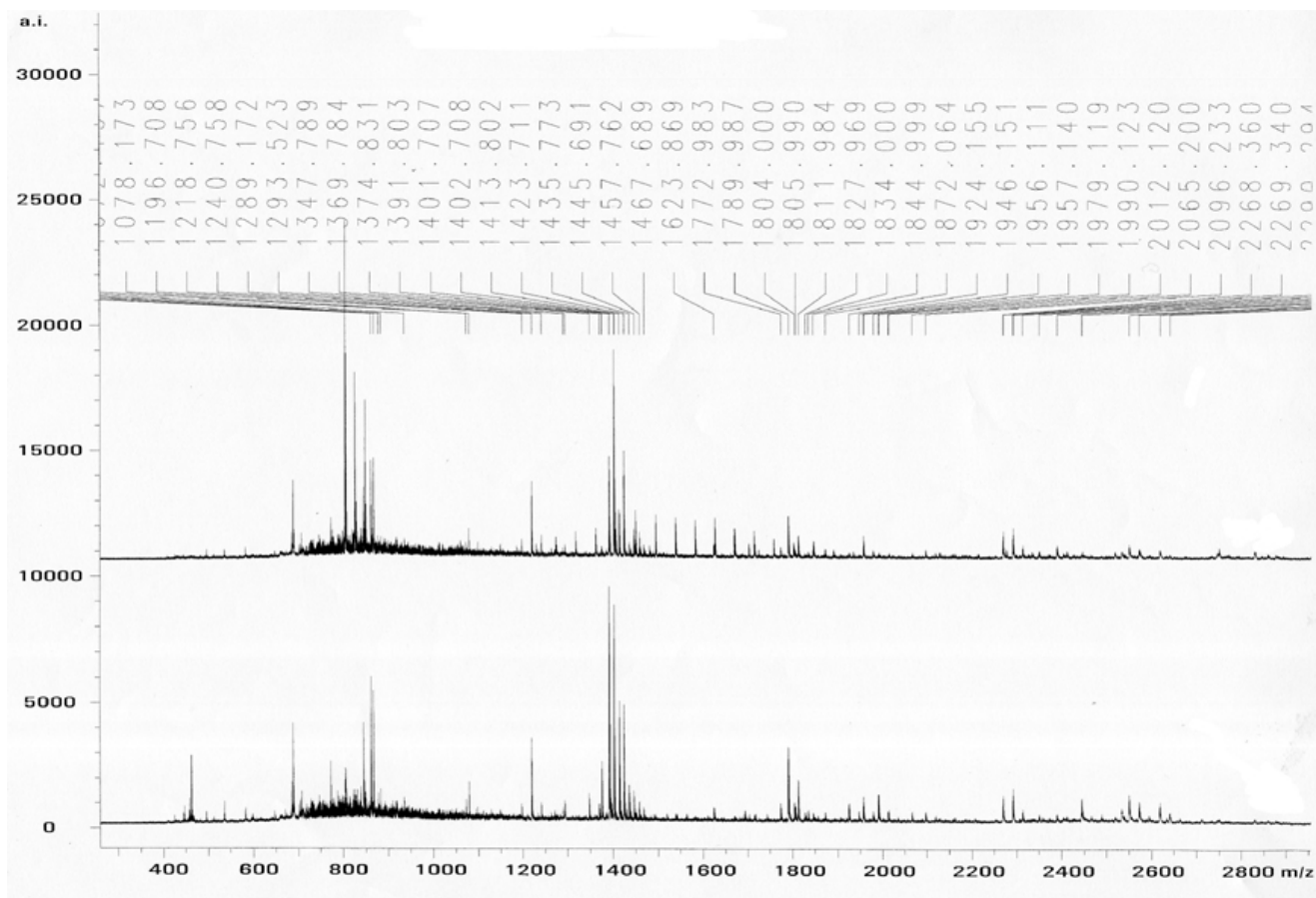


Figure 6-3: Bruts de protéolyse V8 de la sous-unité γ analysés par MALDI-TOF.
 Les rapports de masse enzyme/sous-unité sont de 1/20 (en haut) et 1/100 (en bas).

oxydation intermoléculaire entre les cystéines des différents peptides. Cette étape est nécessaire pour les purifications CLHP, les analyses en spectrométrie de masse et les séquençages ultérieurs (Rosenfeld et al., 1992). Les bouts de gels sont à nouveau lavés et partiellement deshydratés. Les solutions d'enzymes pénètrent ensuite dans le gel par « effet éponge », et les protéines acétylées sont soumises à la digestion « in-gel » dans des rapports de masse enzyme/récepteur de 1/20 et 1/100. Le tampon utilisé est un tampon phosphate à pH 7,8, ce qui permet à la protéase V8 de couper sélectivement après les acides aspartiques et glutamiques. Les peptides issus de la digestion sont extraits (par 20 µl d'acide formique 3% / ACN 70 % sous très forte agitation pendant 10 min puis par sonication pendant 10 min), concentrés par « zip-tip », et un aliquot est analysé par MALDI-TOF.

La **Figure 6-3** représente les spectres de masse des bruts de protéolyse de la sous-unité γ par la V8 protéase. Les pics présents autour de $m/z = 800$ sont caractéristiques de la matrice utilisée. Un témoin sans protéine nous permet de déterminer les pics correspondant à l'autolyse de la V8. Les signaux correspondant au nAChR sont intenses et nombreux, la protéolyse avec un rapport enzyme/protéine de 1/20 étant significativement plus efficace. La protéolyse « in-gel » semble donc réalisable avec la protéase V8, au moins pour des quantités analytiques de nAChR. Nous avons donc décidé d'appliquer la technique de protéolyse « in gel » par la V8 sur le récepteur nicotinique de torpille.

Néanmoins, l'attribution des pics ne fût pas aisée, étant donné que nous ne connaissions pas à l'époque les séquences exactes des sous-unités γ et δ . Bien que l'identité de séquence soit très importante entre les homologues *marmorata* et *californica*, il existe 12 et 13 résidus différents, respectivement, par sous-unité, ce qui complique significativement l'attribution de pics.

D) Analyse MALDI-TOF différentielle du photomarquage par AC5

L'identification des peptides alkylés par une sonde non-marquée peut théoriquement se faire directement par MALDI-TOF sur un brut de protéolyse. Il s'agit dans ce cas de repérer dans le spectre correspondant au récepteur marqué l'apparition d'un nouveau pic, dont la masse doit correspondre à la somme de la masse du peptide et de la masse de la sonde. La sensibilité du MALDI-TOF (< 100 fmoles) permet effectivement de détecter directement le photoadduit, par analyse différentielle, même lorsqu'une faible proportion (~ 5 %) de la protéine est covalamment modifiée (Kramer et al., 2001). Cette approche est séduisante puisqu'il n'est plus nécessaire d'utiliser la sonde sous forme radioactive.

Dans notre cas, AC5 s'incorpore sur les sous-unités γ et δ avec des rendements de photomarquage supérieurs à 5%, ce qui est suffisant théoriquement pour mettre en évidence des photoadduits. Si de plus nous utilisons plusieurs enzymes afin d'identifier par MALDI-TOF les différents peptides marqués, le recoupement des séquences peptidiques devrait nous permettre d'affiner la zone de contact entre la sonde et le récepteur. Nous avons ainsi tenté d'identifier, par analyse différentielle, les peptides marqués par AC5 et issus des protéolyses par trois enzymes différentes: l'EndoGlu-C (V8), l'EndoLys-C et la trypsine. Il faut noter toutefois que la sonde AC5 possède une liaison ester qui peut être sensible aux conditions hydrolytiques de séparation des protéines (SDS-PAGE), de digestion ou d'extraction des peptides (milieu acide). La masse attendue des peptides marqués peut donc être supérieure de 349,2 Da (photoadduit d'AC5) ou de 263,3 (photoadduit de PH5) par rapport à la masse du peptide non marqué.

Les membranes riches en nAChR (60 μ g, $\sim$ 180 pmoles de sites [125 I] α -BgTx) ont donc été préincubées en présence de 15 μ M de proadifène et de 250 μ M de DIFP pendant 45 minutes, puis irradiées avec 1 μ M d'AC5 dans les conditions classiques d'irradiation (voir Chapitre IV). Le marquage non spécifique est réalisé en présence de 100 μ M de CCh. Un aliquot correspondant à 20 μ g de protéines est soumis à une séparation par mini-gel SDS-PAGE 10 %, puis les bandes correspondant aux sous-unités γ et δ du récepteur nicotinique sont excisées et soumises à une digestion "in-gel" avec les enzymes EndoGlu-C (V8), EndoLys-C ou Trypsine (rapports de masse enzyme/récepteur de 1/50). Les peptides issus des digestions sont extraits, concentrés par "zip-tip", et un aliquot est analysé par MALDI-TOF.

L'analyse MALDI-TOF des différents digests a malheureusement été décevante: aucune enzyme ne nous a permis de mettre en évidence un peptide présent dans les conditions de marquage sans CCh, et absent lors d'une protection des sites agonistes par 100 μ M de CCh (résultats non montrés). Il est possible que le marquage soit réparti sur plusieurs peptides, et qu'il ne soit pas assez intense pour être analysé. Il est également possible que, du fait du grand nombre de peptides de masses différentes (brut de protéolyse), on ait une suppression des signaux des peptides marqués. Il serait donc judicieux d'effectuer une pré-purification avant analyse MALDI-TOF, mais ceci nécessite l'emploi d'un ligand radiomarké et l'utilisation de grandes quantités de nAChR.

II) Analyse du photomarquage préparatif par [³H]AC5

Le nAChR de torpille étant disponible en grande quantité, nous avons décidé de réaliser un photomarquage préparatif du nAChR avec le marqueur de photoaffinité radiomarké [³H]AC5. En effet, le photomarquage à l'échelle préparative du nAChR a été utilisé avec succès au laboratoire, sur la sous-unité α notamment, afin d'identifier les acides aminés photomarkés par différentes sondes compétitives (Dennis et al., 1988; Galzi et al., 1991; Grutter et al., 2000) mais également dans d'autres laboratoires pour identifier les résidus photomarkés par des agonistes et antagonistes compétitifs sur γ et δ (Chiara & Cohen, 1997; Chiara et al., 1998; Wang et al., 2000; Chiara et al., 2003).

A) Extraction des peptides

L'irradiation préparative est réalisée sur de grandes quantités de membranes enrichies en récepteurs (8-15 nmoles de sites [¹²⁵I] α -BgTx), préincubées avec 15 μ M de proadifène (état désensibilisé) et 250 μ M de DIFP (inhibiteur d'AChE). Le marquage non-spécifique est réalisé en présence de 100 μ M de CCh. A l'issue de l'irradiation préparative, les échantillons sont soumis à un gel SDS-PAGE 8%. Les bandes correspondant aux sous-unités γ et δ sont excisées, puis les protéines sont acétylées et digérées « in gel » : la majorité par la protéase V8, une faible portion ($\sim$ 1 nmole) par la trypsine. Durant les différentes étapes de lavage, deshydratation et réhydratation du gel, les surnageants sont récupérés et la radioactivité éluée est quantifiée : on a une perte de 10 à 20 % de la radioactivité contenue dans le gel.

A l'issue de la digestion, les bouts de gel sont broyés, et les peptides sont extraits par plusieurs cycles d'élution passive avec le mélange d'extraction (50 % H₂O, 0,05 % TFA, 15 % ACN, 35 % n-propanol, 0,1 % n-octyl- β -D-glucopyranoside). Le broyage des bouts de gel, le chauffage à 95°C, la sonication, ainsi que la présence des solvants organiques et du détergent se sont révélés essentiels à une bonne extraction des peptides. Quatre à cinq cycles d'extractions des peptides issus de la protéolyse V8, durant 2-3 jours, sont nécessaires pour extraire environ 50 - 60 % de la radioactivité contenue au niveau de δ et environ 20 - 40 % de celle contenue au niveau de γ . Le matériel non élué correspond soit à des agrégats de protéines, soit à une protéolyse « in gel » partielle. Les peptides issus de la protéolyse par la

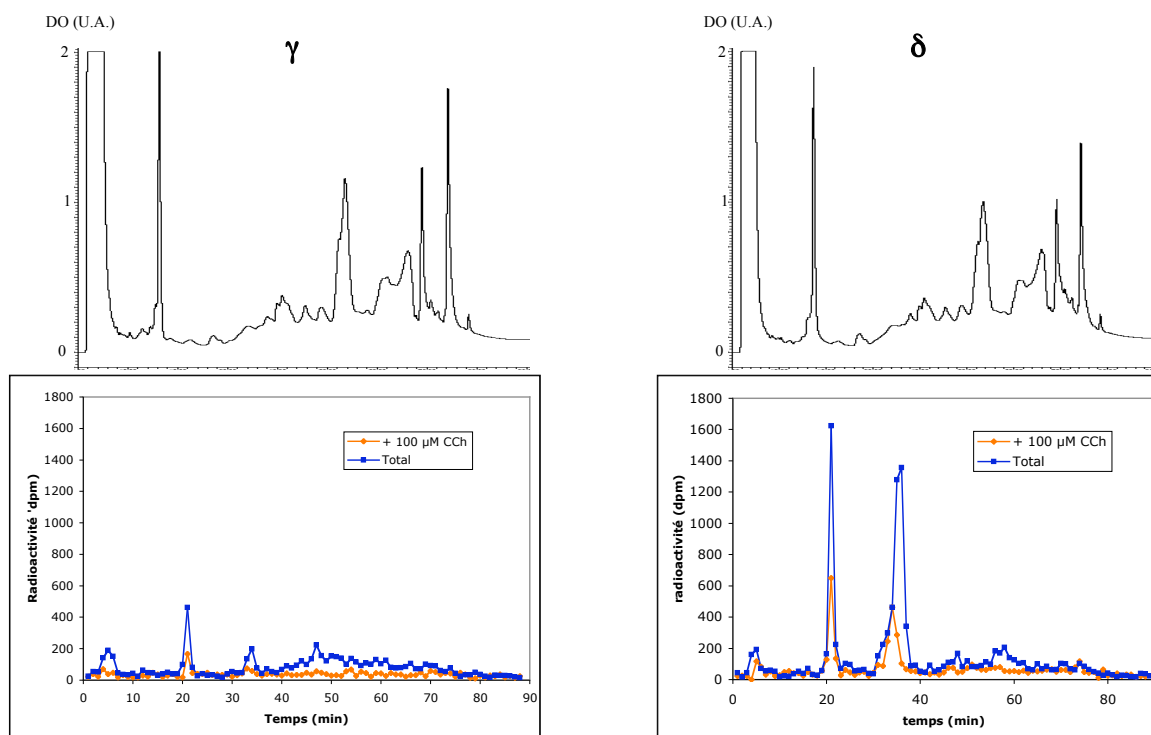


Figure 6-4: Profils CLHP des peptides issus de la coupure des sous-unités γ et δ par la protéase V8. Les peptides extraits des morceaux de gel sont injectés sur une colonne phase inverse C_4 couplée au système CLHP, et élués selon le gradient 3 (voir partie expérimentale). Le débit est de 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ et les fractions sont collectées toutes les minutes (volume 200 μl). La détection du signal est assuré par UV (214 nm) et par quantification de la radioactivité. La distribution de la radioactivité, correspondant au marquage en absence (bleu) ou en présence (orange) de 100 μM de CCh, est quantifiée par comptage d'un aliquot de 10 μl sur les 200 μl .

trypsine sont extraits avec des rendements généralement 1,2 à 1,5 fois supérieurs. Cette différence d'élution peut refléter soit une meilleure élution générale de tous les peptides issus de la protéolyse par la trypsine, soit une meilleure élution uniquement du (des) peptide(s) radioactif(s) généré(s) par le photomarquage. Ce phénomène peut s'expliquer soit par des peptides radiomarqués plus hydrosolubles ou de masse moléculaire plus faible, soit par un rendement de protéolyse supérieur avec la trypsine.

Les éluats sont ensuite rassemblés, puis concentrés à 500 µl sous un flux d'argon. La présence de détergent ne permet pas de concentrer plus les échantillons, par risque de floculation. Les solvants organiques sont tout de même évaporés sous flux d'argon, en maintenant constant le volume de l'échantillon à l'aide d'une solution de TFA 0,1%.

B) Première purification CLHP des peptides

Un aliquot des peptides issus de la protéolyse V8 et de la trypsinolyse sont analysés par mini-gel tricine. Le reste des peptides issus de la protéolyse V8 est injecté par CLHP pour purification. Les fractions CLHP radioactives sont ensuite analysées par MALDI-TOF.

- Purification CLHP des peptides : la purification préparative des peptides est réalisée sur une colonne phase inverse C₄ couplée au système CLHP. La détection des peptides marqués se fait à la fois optiquement (détecteur UV 214 nm) et par quantification de la radioactivité (voir **Figure 6-4**).

Les chromatogrammes des peptides des sous-unités γ et δ ont tous les deux des profils UV et radioactifs très proches. Ils présentent deux fractions majoritairement marquées, de manière protégeable par 100 µM de CCh (55 – 70 %), et éluées aux alentours de 21 et 35 minutes. Les fractions éluées à 21 minutes présentent également un pic d'absorption intense à 214 nm. Les rendements de la colonne sont très bons, puisque plus de 90 % de la radioactivité est retrouvée après élution.

Les rendements d'extraction des peptides de la sous-unité γ sont, nous avons vu, inférieurs à ceux de la sous-unité δ . La quantité de peptides γ injectés sur la colonne C₄ (~ 95 000 dpm) est donc bien inférieure à la quantité de peptides δ injectés (~ 220 000 dpm), alors que les rendements de photoincorporation de la sonde [³H]AC5 sont supérieurs sur γ . Par ailleurs, la radioactivité éluée entre 40 et 75 minutes sur les chromatogrammes correspond

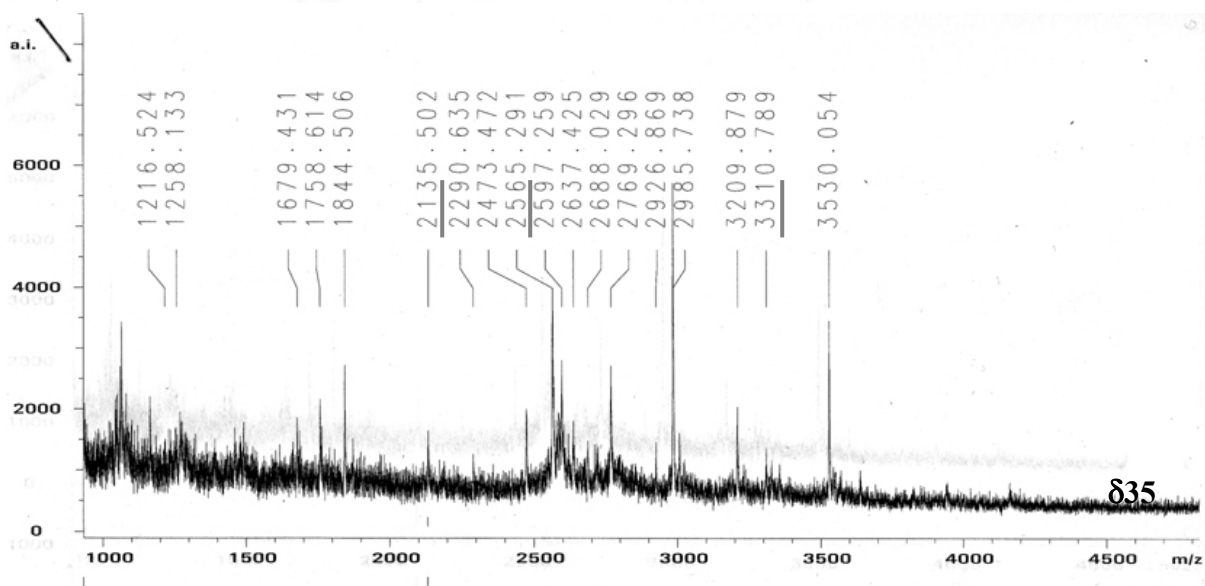
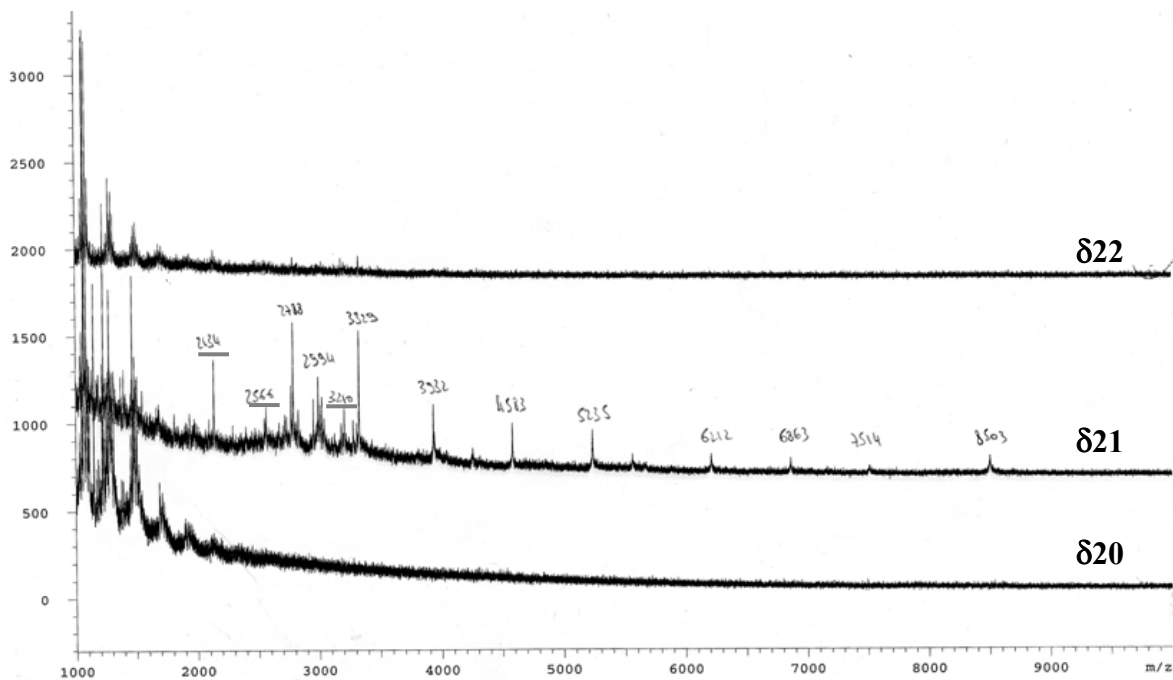


Figure 6-5: Analyse MALDI-TOF des fractions $\delta 20$, $\delta 21$, $\delta 22$ et $\delta 35$ issues de la première purification CLHP. Les masses communes aux fractions $\delta 21$ et $\delta 35$ sont soulignées.

probablement à une protéine partiellement protéolysée, mais extraite du gel. La quantité de protéines partiellement protéolysées semble supérieure dans le cas de γ (**Figure 6-4**), ce qui pourrait expliquer en partie les rendements d'extraction plus faibles de cette sous-unité. Il serait donc judicieux d'améliorer les conditions de protéolyse « in gel » de cette sous-unité (temps, température, quantité d'enzyme...).

- Analyse MALDI-TOF : les fractions les plus radioactives des éluats de CLHP (γ et δ 20-22, δ 34-36, γ 33-34) sont ensuite analysées par MALDI-TOF (voir **Figure 6-5**).

Les fractions γ et δ 21 présentent de nombreux pics de peptides, mais également de nombreux pics parasites provenant de polymères, vers $m/z = 1000$. Par ailleurs, la fraction δ 21 contient des peptides qui sont également présents dans les fractions δ 34-36 et (2134, 2566 et 3210 par exemple). Il est donc fort probable que ces fractions 20-22, qui présentent sur les chromatogrammes γ et δ un pic à 214 nm intense, correspondent au relargage du détergent n-octyl- β -D-glucopyranoside utilisé pour l'extraction des peptides. Ce détergent entraînerait avec lui de nombreux peptides, marqués ou non. La quantité de détergent utilisée pour l'extraction des peptides est donc peut-être supérieure à la limite de compatibilité avec la purification CLHP. Il serait donc judicieux de remettre au point les conditions d'extraction, en utilisant moins de détergent, et en augmentant les temps d'extraction par exemple.

On n'observe aucun peptide en MALDI-TOF en analysant les fractions γ 33 et 34. Soit la taille du peptide marqué est trop petite et le pic est masqué par ceux de la matrice, soit la quantité de peptide est trop faible pour être analysée en MALDI-TOF.

Les fractions δ 34-36 sont composées de nombreux peptides, dont certains sont communs à la fraction δ 21 (**Figure 6-5**).

En conclusion, soit on a trop peu de signal (fractions provenant de γ), soit la pureté n'est pas suffisante (fractions provenant de δ) pour séquencer les peptides et identifier les peptides marqués. Nous avons donc décidé de repurifier les peptides marqués de la sous-unité δ .

C) Seconde purification CLHP des peptides de la sous-unité δ

Les fractions δ 20-22 et δ 33-38 de la première purification CLHP sont rassemblées, concentrées et purifiées de nouveau par CLHP. On appellera ces fractions δ_1 et δ_2

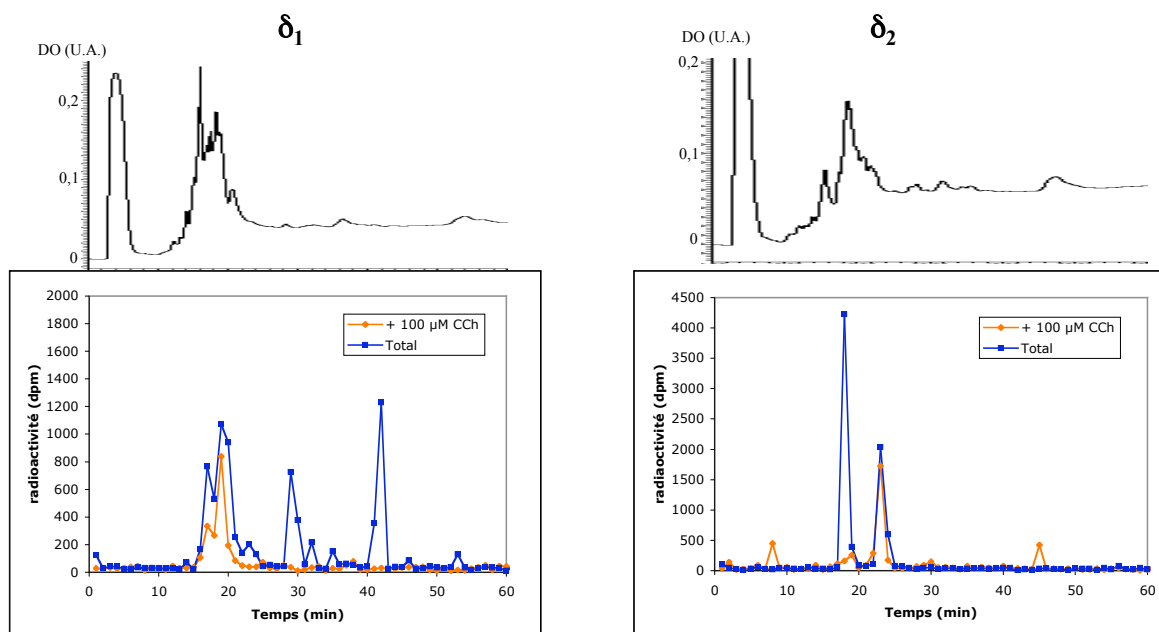


Figure 6-6: Purification CLHP des fractions δ 20-22 (δ_1) et δ 33-38 (δ_2). Les fractions 20-22 et 33-38 de la première purification CLHP des peptides δ issus de la digestion V8 sont repurifiées sur colonne phase inverse C_4 couplée au système CLHP, et éluées selon le gradient 4 (voir partie expérimentale). Le débit est de 200 μ l/min et les fractions sont collectées toutes les minutes (volume 200 μ l). La détection du signal est assurée par UV (214 nm) et par quantification de la radioactivité. La distribution de la radioactivité, correspondant au marquage en absence (bleu) ou en présence (orange) de 100 μ M de CCh, est quantifiée par comptage d'un aliquot de 30 μ l sur les 200 μ l.

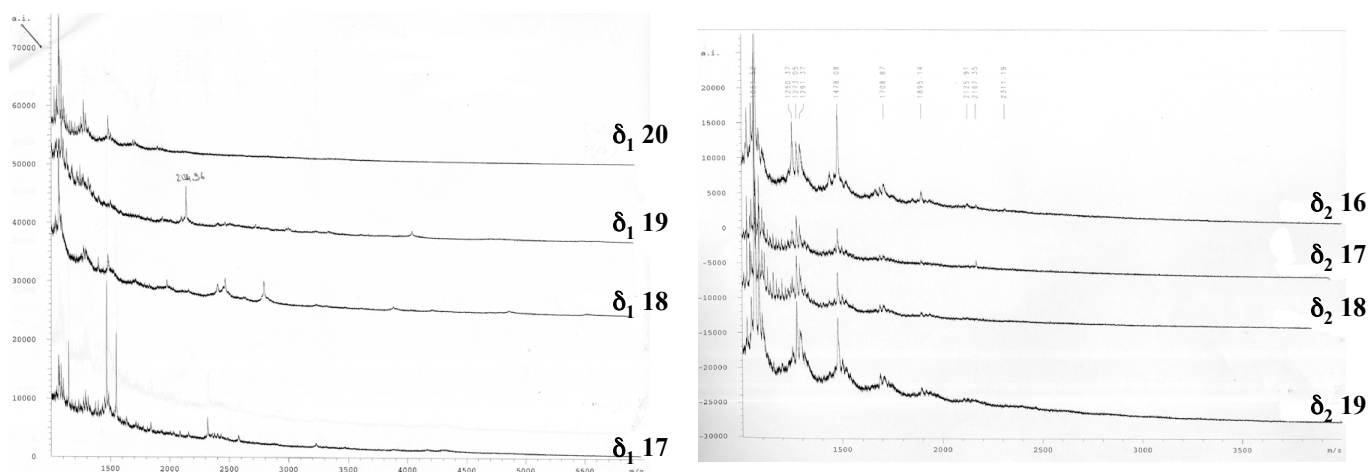


Figure 6-7: Analyse MALDI-TOF des fractions radioactives issues de la deuxième purification CLHP.

respectivement par la suite. Les fractions les plus radioactives de la deuxième purification sont ensuite analysées par MALDI-TOF, et celles qui nous paraissent intéressantes sont caractérisées par séquençage d'Edman.

- Purification CLHP des peptides : on concentre les fractions δ_1 et δ_2 jusqu'à un volume de 200 μ l, puis on ajoute 300 μ l de TFA 0,1 % et ces échantillons sont injectés sur une colonne phase inverse C_4 couplée au système CLHP. Les deux échantillons sont élués avec un gradient moins éluatif que celui utilisé pour la première purification (gradient 4, voir partie expérimentale). Les chromatogrammes obtenus sont présentés en **Figure 6-6**.

La fraction δ_1 présente, de manière inattendue, quatre pics principaux de radioactivité. Les deux premiers pics, partiellement protégeables (~ 50 %), sont élués au alentours de 15 à 20 min. Les deux autres pics, élués à 29 et 42 min, sont quasiment totalement (> 95 %) protégeables.

La fraction δ_2 présente deux pics principaux de radioactivité : le premier, élué à 18 min est protégeable à 95 % tandis que le deuxième, élué à 23 min, n'est pratiquement pas protégeable (< 15 %).

D'une manière générale, les peptides sont élués bien trop tôt ; le choix du gradient 4 ne fût donc pas judicieux. Néanmoins, nous avons analysé les fractions les plus radioactives par MALDI-TOF.

- Analyse MALDI-TOF : Les fractions δ_1 17 à 20, 29 et 42, ainsi que les fractions δ_2 16 à 19 et 23 sont concentrées jusqu'à un volume d'environ 10 μ l, puis analysées par MALDI-TOF.

Plusieurs peptides sont présents dans les fractions δ_1 17, 18, 19 (voir **Figure 6-7**). Les fractions δ_1 29 et 42 ne présentent par contre pas de pic caractéristique de peptides.

Aucune fraction δ_2 ne présente de pic majeur caractéristique de peptides (voir **Figure 6-7**).

L'analyse MALDI-TOF s'avère donc une nouvelle fois décevante : soit on a perdu le signal peptidique, soit la pureté n'est pas suffisante. Etant donné qu'il n'est pas possible, pour des raisons de stabilité et de perte de matériel, de réaliser une troisième purification CLHP, nous avons décidé de passer au séquenceur les fractions les plus radioactives, même si aucun pic n'est présent en MALDI-TOF. Il est donc crucial de développer une nouvelle méthode d'extraction des peptides du gel, apportant une alternative au détergent utilisé.

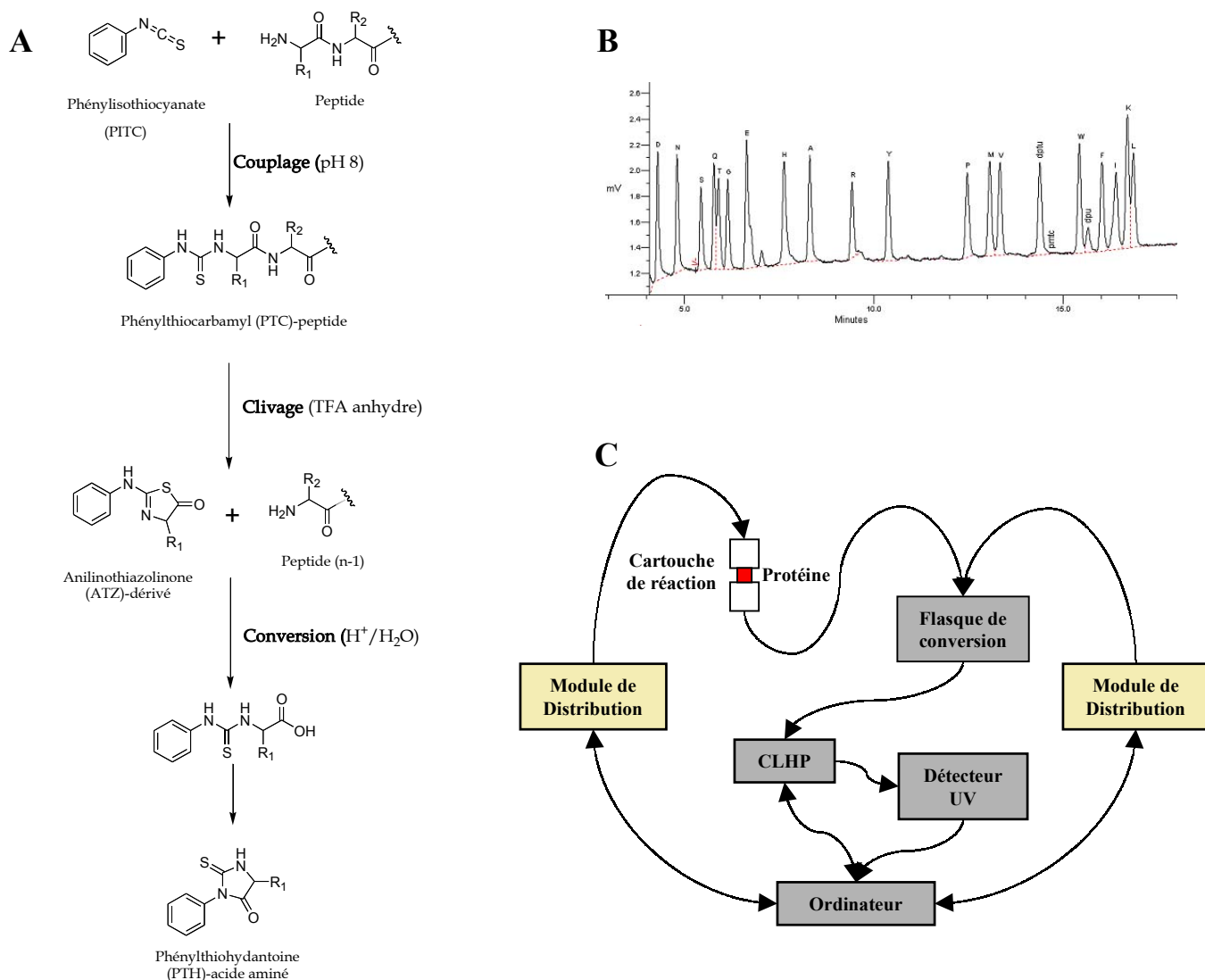


Figure 6-8: Principe du séquençage d'Edman. (A) En présence de tampon N-méthyl pipéridine, le phénylisothiocyanate (PITC) se couple aux fonctions amines primaires et secondaires des protéines. La liaison peptidique suivante est fragilisée ce qui permet sa coupure en 3 minutes par l'acide trifluoracétique (TFA) pur générant ainsi l'anilino-thiazolinone (ATZ) du premier acide aminé (AA) et la protéine ayant perdu le 1er AA. L'ATZ-AA est extrait du milieu réactionnel et converti en milieu acide (TFA à 25 % dans l'eau) en phényl thiohydantoïne (PTH-AA) plus stable. (B) Le PTH-AA peut donc être analysé par HPLC et sa nature déterminée grâce à un étalon de PTH-AAs. Le cycle de réaction peut être répété et conduit ainsi à la séquence de la protéine. (C) Le séquenceur automatique est couplé à une CLHP dans laquelle le PTH-AA est injecté. Par comparaison avec un spectre étalon, il est alors possible d'identifier l'acide aminé d'origine et d'obtenir sa quantification. Le cœur du séquenceur est la cartouche de réaction qui contient la protéine à analyser. Le module de distribution y fait parvenir les réactifs et solvants nécessaires à la réaction d'Edman. L'ATZ-AA en est extrait et dirigé vers la flasque de conversion qui le transforme en PTH-AA. Celui-ci est alors injecté dans l'HPLC. Le tout est sous le contrôle d'un ordinateur qui pilote les différents éléments et assure l'acquisition de données ainsi que leur traitement.

- **Séquençage** : le micro-séquençage est réalisé par Christine Lichte (IBMC, Strasbourg) automatiquement selon la méthode de dégradation d'Edman (**Figure 6-8**). Le principe du séquençage automatique s'articule autour de trois étapes :

1. Le couplage : les échantillons peptidiques sont déposés sur un support solide (filtre) sur lequel se réalise la réaction de couplage entre l'extrémité N-terminale et le phénylisothiocyanate (PITC).

2. Le clivage : le clivage de la liaison peptidique est réalisé dans du TFA anhydre avec formation du produit anilinothiazolinone (ATZ)

3. La conversion : l'ATZ est transféré dans le flacon de conversion, puis convertie en phénylthiohydantoïne de l'acide aminé (PTH-AA). Le PTH-AA est analysé sur un système CLHP connecté au séquenceur et la détection est assurée par UV. Chaque résidu est analysé selon le temps de rétention CLHP caractéristique du PTH-AA correspondant.

En raison de rendements de coupure et d'extraction, les PTH-AA ne sont pas toujours visibles en UV. Par exemple les chaînes latérales des sérines et thréonines se déshydratent et forment des PTH- Δ Ser et PTH- Δ Thr qui sont peu visibles lors de l'analyse. De plus, les cystéines ne sont pas non plus visibles. Il est donc rare de pouvoir identifier l'enchaînement complet des résidus appartenant à une même séquence. Les peptides sont donc facilement identifiables lorsque l'on connaît la séquence de la protéine.

Les fractions de marquage total δ_1 17 (~ 4 500 dpm), δ_1 19 (~ 6 000 dpm), δ_2 16 (~ 60 000 dpm) et δ_2 21 (~ 30 000 dpm) ont été analysées par séquençage.

Le séquençage de la fraction δ_1 17 a permis d'identifier sans ambiguïté quatre peptides appartenant à la sous-unité δ (**Tableau 6-1**), mais aucun d'entre eux ne se trouve dans le domaine N-terminal extracellulaire du nAChR (**Figure 6-9**). Par ailleurs, aucun relargage de la radioactivité n'a été mis en évidence pendant 20 cycles.

Le séquençage de la fraction δ_1 19 a permis d'identifier sans ambiguïté deux peptides appartenant à la sous-unité δ , mais également en dehors du domaine de liaison d'AC5 (voir **Tableau 6-1**). De la même manière, aucun relargage de radioactivité n'a été mis en évidence durant 25 cycles.

Malgré l'importante radioactivité contenue dans les fractions δ_2 16 et δ_2 21, et malgré l'importance des signaux au premier cycle (10 et 35 pmoles respectivement), aucun peptide n'a pu être identifié. Les signaux étaient effectivement confus puisqu'à certains cycles

Frac ton	n°	Pept ile	n° pr ome r résidu	Quanti é (pmole)	Masse théorique	Masse MALDI
δ_1 17	1	LMFE	378	46	537,7	n.d.
	2	YFNIKSRSE	369	23	1142,4	1144,8
	3	PFDYSSDHPRCA(C t rminal)	487	14	1465,0	1466
	4	LKLRRSSSVGYISKAQE	352	10	1922	n.d.
δ_1 19	5	RHGLVPRVTPRIGFGNNNE	386	16	2132,6	2134,9
	6	IKSGIDSTNYIVKQIKE	416	38	1936,5	n.d.

T a blea u 6-1: Peptides identifiés p ar séquenç a g des fracti ons δ_1 17 et δ_1 19. La quantité estimée d pep tid eest in d i cée (n . d . epp i d e n o n étécté s ur sp ectre MALDI-TOF).

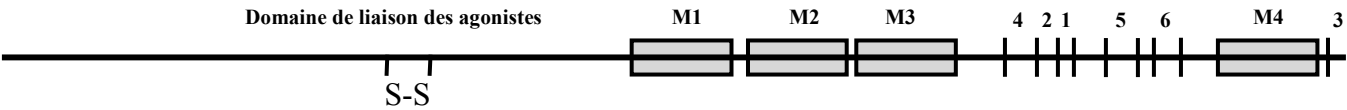


Figure 6-9: Positionnement schématique des peptides identifiés par séquençage des fractions δ_1 17 et δ_1 19. Les domaines transmembranaires M1 à M4 et le pont disulfure du domaine de liaison au agoniste sont indiqués.

on ne percevait aucun signal UV, puis subitement les signaux de tous les acides aminés augmentaient au cycle suivant. Il est possible que le séquençage de ce peptide soit rendu difficile par le photoadduit, ou par l'adoption d'une conformation privilégiée. Nous avons vérifié que ce problème de séquençage n'était pas inhérent à l'appareil en séquençant la β -lactoglobuline commerciale. Par ailleurs, aucun relargage de la radioactivité n'a été mis en évidence, et ceci durant 15 cycles pour δ_2 16 et durant 30 cycles pour δ_2 21. Aucune radioactivité n'a été retrouvée sur les filtres sur lesquels ont été déposés les peptides. Il est possible, mais nous n'avons pas pu le vérifier, que les peptides soient adsorbés sur les parois du tube eppendorf.

En conclusion, le séquençage ne nous a pas permis d'identifier un peptide marqué par [^3H]AC5 sous l'état désensibilisé du récepteur.

III) Conclusion

En conclusion, aucun peptide marqué n'a pu être mis en évidence à l'aide de ce protocole. Nous ne connaissons donc pas avec certitude la zone d'interaction du groupement aryldiazonium d'AC5 sous l'état D du nAChR. Les raisons en sont multiples, mais nous proposons quelques alternatives pour accéder aux acides aminés marqués:

- le protocole d'extraction des peptides du gel est à optimiser. Comme nous l'avons vu, la présence de détergent perturbe la purification CLHP et l'analyse MALDI-TOF des peptides. Il serait donc peut être plus judicieux de ne pas utiliser de détergent, ou une quantité plus faible. Par ailleurs, l'extraction des peptides issus de la protéolyse V8 nécessite des conditions assez drastiques ; il est donc fort possible que les peptides marqués soient hydrophobes et/ou de taille importante. L'utilisation d'une autre enzyme permettrait peut-être d'augmenter les rendements d'extractions (comme on l'a vu pour la trypsine).
- Le protocole de digestion « in-gel » avec la protéase V8 est lui aussi à améliorer. Les séquençages nous ont permis de voir que les protéolyses n'étaient pas complètes, la coupure après les acides aspartiques semblant plus difficile à réaliser. Il s'agit là aussi d'améliorer les conditions de coupure, notamment en augmentant la quantité d'enzyme et le temps d'incubation.
- le fait de ne pas avoir eu la séquence de la protéine à notre disposition complique les analyses MALDI-TOF, puisqu'elle ne nous permet pas par exemple d'effectuer les recherches informatiques auprès de bases de données. Lors de l'analyse des bruts de protéolyse du récepteur non marqué, nous avons cherché, dans les banques de données, à quelles protéines pouvaient correspondre les peptides générés. Cette recherche s'est révélée peu fructueuse, et de plus n'a mentionné aucune sous-unité du nAChR de *T.californica*. Ce problème est néanmoins depuis peu résolu par la publication dans les bases de données des séquences des sous-unités β , γ et δ du nAChR de *Torpedo marmorata* (Tierney et al., 2004). Il sera de plus désormais possible d'utiliser la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), qui permet l'ionisation, donc la séparation des peptides, puis la fragmentation de peptides isolés. Cette fragmentation permet notamment d'avoir des informations sur la séquence des peptides.

- Le temps qui s'est écoulé entre le marquage préparatif et le séquençage des peptides était bien trop long (environ 6 mois), ce qui peut entraîner une dégradation ou une absorption des peptides sur la paroi des tubes eppendorf.
- Il a fallu deux étapes de purification CLHP pour purifier suffisamment les peptides en vue du séquençage. Or, le nombre d'étapes de purification doit être limité afin d'éviter toute perte intempestive de matériel. Il serait donc judicieux de n'effectuer qu'une purification avec un gradient plus approprié.
- Cette purification CLHP doit être suffisante pour ne pas avoir à injecter un mélange complexe sur le séquenceur, mais ne doit pas conduire à la séparation du peptide marqué (qui représente environ 5 % des peptides totaux) et du peptide identique mais non-marqué (soit 95 % des peptides). En effet, les caractéristiques physicochimiques de la sonde utilisée peuvent entraîner des variations de temps de rétention des peptides sur colonne CLHP. Ceci n'était pas un problème dans le cas du marquage avec [³H]DDF pour lequel les rendements de photomarquage dépassaient 60 %, ni dans le cas du [³H]DCTA qui est une sonde de taille modérée. [³H]AC5 est une sonde de taille importante, doublement chargée, qui peut modifier considérablement le temps de rétention d'un peptide sur colonne en phase inverse, surtout si le peptide en question est de faible masse moléculaire. On aurait ainsi une dissociation du signal UV et du signal radioactif. Il est possible que, lors de la deuxième purification CLHP, nous nous soyons heurté à ce problème ; en effet, nous avons toujours un fort signal radioactif (30 000 à 60 000 dpm) pour les fractions δ_2 , mais aucun signal en MALDI-TOF ou au séquenceur.
- Il est également possible que [³H]AC5, de par sa nature flexible, marque de nombreux résidus, localisés sur de nombreux peptides. On aurait donc une dilution du signal radioactif. Cependant, étant donné les profils CLHP, cette hypothèse semble peu probable.

Les conditions sont donc réunies pour que nous puissions prochainement connaître les acides aminés photomarkés par l'agoniste [³H]AC5 sous l'état désensibilisé du récepteur. Ce travail est en cours au laboratoire.

IV)Partie expérimentale

A) Généralités

Tampon C: 10 mM phosphate de sodium, pH 7,2, 100 mM NaCl, inhibiteurs de protéase Roche complete mini EDTA-free

Tampon D: 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20 % glycérol, 5 % SDS, 0,01 % bleu de bromophénol, 100 mM DTT ajouté extemporanément.

Tampon G: 25 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5.

Tampon H: 25 mM NaPi, pH 7,8.

Tampon I: 25 mM Tris-Hcl, pH 8,5, 1 mM EDTA.

Tampon J: 50 mM NH_4HCO_3 , pH 8,5.

Mélange d'extraction: 50 % H_2O , 0,05 % TFA, 15 % ACN, 35 % n-propanol, 0,1 % n-octyl- β -D-glucopyranoside.

Spectrométrie de masse: Les spectres de masse sont effectués sur un appareil Bruker Biflex III, en mode positif, mode linéaire ou réflectron.

CLHP: Les purifications des peptides marqués sont effectuées sur une colonne phase inverse C₄ Vydac (2,1 x 150 mm ou 4,6 x 250 mm) couplée au système CLHP. Le système CLHP est contrôlé par un Waters W600S Controller. Le système de détection est un Waters W486 Tunable Absorbance Detector.

Solvant A : H_2O / TFA 0,05 %

Solvant B : ACN / TFA 0,05 %

Gradient 3 : 98 % - 40 % solvant A en 60 min

40 % - 0 % solvant A en 10 min

100 % solvant B pendant 5 min

débit : 200 $\mu\text{l}/\text{min}$

Gradient 4 : 98 % - 72 % solvant A en 10 min

72 % - 59 % solvant A en 65 min

59 % - 40 % solvant A en 10 min

40 % - 0 % solvant A en 10 min

100 % solvant B pendant 5 min

Séquenceur: les microséquençages sont effectués sur un Procise cLC, modèle 492, Applied BioSystem.

B) Photomarquage préparatif des récepteurs de torpille par [³H]AC5

De grandes quantités de membranes enrichies en récepteurs (8-15 nmoles de sites [¹²⁵I]α-BgTx, 400 nM), pré-incubées par 15 μM de proadifène et 250 μM de DIFP pendant 45 minutes, sont irradiées à 385 nm (120 μV) en présence de 1 μM de [³H]AC5 (volume final 1,5 ml, tampon C) pendant 15 minutes à 10°C. Pour les expériences de protection, 100 μM de CCh sont ajoutés 30 minutes avant l'irradiation. Afin de photoalkyler les 15 nmoles de sites, 20 irradiations successives ont été nécessaires.

A l'issue de l'irradiation, les échantillons sont centrifugés à 11000 g pendant 30 minutes à 4°C et les culots sont repris dans le tampon de charge d'électrophorèse. Les échantillons sont soumis à un gel SDS-PAGE 8 %.

C) Photomarquage analytique des récepteurs de torpille par AC5

Le protocole utilisé est identique à celui décrit pour le photomarquage analytique avec [³H]AC5 (partie expérimentale du Chapitre 4), la seule différence provenant de l'utilisation de la sonde non-marquée à une concentration de 1 μM.

D) Protéolyse « *in gel* » des sous-unités β, γ et δ par les protéases V8, EndoLys-C et Trypsine.

- Récupération des sous-unités (Rosenfeld et al., 1992)

Le gel est coloré pendant 20 minutes avec une solution aqueuse contenant 0,05 % de bleu de coomassie (R-250), 25 % méthanol, et 5 % d'acide acétique puis le gel est décoloré avec une solution aqueuse de 30 % de méthanol selon le protocole modifié de Rosenfeld (Rosenfeld et al., 1992). Les bandes correspondantes aux sous-unités β, γ, δ (2 à 3 nmoles) sont excisées du gel, coupées en petits bouts de quelques mm³, transférées dans des tubes Eppendorf (low binding lavés 15 min dans 50 % MeOH, 5 - 10 % AcOH, puis séchés) puis congelées à -30°C ou utilisées directement.

- Réduction / alkylation

Les fragments de gel qui contiennent les sous-unités β , γ et δ sont lavés vigoureusement par 2 x 500 μ l d'une solution aqueuse d'ACN (50 %) à T.A. pendant 10 minutes. Les surnageants sont éliminés et les fragments de gel sont déshydratés par 500 μ l d'ACN à T.A. pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés et les bouts de gel sont réhydratés par 500 μ l de tampon H pendant 5 min à T.A., puis 500 μ l d'ACN sont ajoutés pendant 5 min. Les surnageants sont éliminés et les fragments de gel réhydratés sont séchés au « Speed-Vac centrifuge » (Savant) selon la technique de semi-dry. Les bouts de gels sont repris dans 500 μ l de tampon G contenant 10 mM de DTT. Après 30 minutes de réduction à 56°C, les sous-unités sont carboxyméthylées par l'ajout d'iodoacétamide 55 mM pendant 30 minutes à T.A. et en absence de lumière. Les fragments de gel sont à nouveau lavés par 2 x 500 μ l de une solution tamponnée d'acétonitrile (50 % tampon G, 50 % ACN) 5 min à T.A.. Une deuxième déshydratation par 500 μ l d'ACN 5 min puis au « Speed-Vac centrifuge » est réalisée après l'étape de digestion.

Remarque : le volume de 500 μ l est utilisé classiquement pour les marquages préparatifs. Il suffit à recouvrir les bouts de gel. Il peut être modulé lorsque la quantité de protéine est moindre.

- Protéolyse « in-gel »

Les fragments de gels sont réhydratés en 5 min, par additions successives de solution enzymatique jusqu'à recouvrement des bouts de gel. Les rapports masse d'enzyme / masse de sous-unité sont classiquement de 1/20 à 1/100. Les enzymes utilisées sont de type « sequencing grade » (ROCHE). La digestion s'effectue dans le tampon H (V8), I (EndoLys-C) ou J (Trypsine), pendant 15 à 20 h, à 25 °C (V8) ou à 37 °C (EndoLys-C et Trypsine). Le tampon phosphate H utilisé pour la V8 permet de couper après les Asp et les Glu.

- Extraction des peptides du gel

Pour les photomarquages analytiques, les peptides issus de la digestion sont extraits des fragments de gel par 20 μ l d'acide formique 3%, ACN 70 % sous très forte agitation pendant 10 min puis par sonication pendant 10 min.

Pour les photomarquages préparatifs, les surnageants sont récupérés, puis les bouts de gels sont broyés. On extrait les peptides avec 500 µl de mélange d'extraction (50 % H₂O, 0,05 % TFA, 15 % ACN, 35 % n-propanol, 0,1 % n-octyl-β-D-glucopyranoside), en chauffant 5 min à 90 °C, en sonicant 10 min, puis en agitant pendant quelques heures. Une mesure analytique de la radioactivité présente dans le surnageant permet de contrôler l'avancement de l'extraction, et de répéter éventuellement les cycles d'extraction.

- Concentration zip-tip des peptides

Pour les analyses MALDI-TOF des photomarquages analytiques uniquement, les peptides issus des extractions sont concentrés et désalés par « zip-tip ». Le « zip-tip » consiste en une résine en phase inverse C4 (volume 2 µl) greffée au bout d'une pointe 10 µl de pipetman. Le « zip-tip » est d'abord conditionné par 80 µl d'ACN 50 %, puis par deux fois 80 µl de TFA 1%. On ajoute 100 µl de TFA 1% à chaque échantillon avant greffage sur la colonne. Les échantillons sont alors greffés sur la colonne C4 en leur faisant faire quatre à cinq aller-retours sur cette colonne. L'élution des peptides se fait par 4 µl d'ACN 50 %. Le volume mort de la colonne étant de 2 µl, les peptides se retrouvent à la fin dans un volume de 6 µl.

E) Purification CLHP des peptides

Les différents surnageants issus de l'extraction (photomarquage préparatif) sont évaporés sous un flux d'azote jusqu'à 500 µl environ. On continue ensuite l'évaporation pendant quelques heures en ajoutant régulièrement une solution de TFA 0,1% afin de garder le volume à 500 µl. Le protéolysat est injecté sur une colonne de phase inverse C₄ Vydac (2,1 x 150 mm ou 4,6 x 250 mm) couplée au système CLHP.

L'absorbance est mesurée à 214 nm (longueur d'onde où absorbent les liaisons peptidiques) et des parties aliquotes des fractions collectées (1 minute/fraction) sont comptées. Les aliquots d'intérêt sont ensuite concentrés jusqu'à une dizaine de µl sous un flux d'azote avant analyse MALDI-TOF.

F) MALDI-TOF

- Préparation des échantillons : les échantillons sont déposés sur la cible entre deux couches de matrice (méthode du sandwich, (Kusmann et al., 1997)). On dépose dans l'ordre :

- 0,8 µl de matrice 1 (acide α -cyano-hydroxycinnamique (HCCA) à saturation dans l'acétone) qu'on laisse sécher quelques secondes
- 0,3 µl de TFA 5% ; on laisse sécher quelques secondes
- l'échantillon en un ou plusieurs ajouts de 0,5 µl (0,8 µl maximum), puis aussitôt
- 0,3 µl de matrice 2 (HCCA à saturation dans 50 % ACN). On laisse sécher 2 min sous la cloche à vide.
- 2 µl de TFA 1 %, que l'on retire aussitôt, afin d'enlever les sels résiduels.

- Analyse des échantillons : La source est un laser à pulsion à azote ($\lambda = 337$ nm). Toutes les études ont été faites en mode positif linéaire. L'acquisition est faite avec 100 coups, en mode positif. Le calibrage est effectué à partir des ions des peptides synthétiques $MH^+ 2199,5$; $3046,4$; $4890,5$.

G) Séquençage

Les fractions radioactives purifiées par CLHP, sont évaporées sous un flux d'azote jusqu'à un volume de 10-15 µl puis sont déposées (5 µl par 5 µl) sur le support solide (filtre en fibre de verre traité au polybrène). La membrane est séchée par un flux d'azote entre chaque dépôt, de manière à ce que l'échantillon ne diffuse pas et soit concentré sur une petite surface. 20 µl d'une solution de 50 % d'acétonitrile/50 % d'acide formique sont rajoutés dans le tube afin de désorber d'éventuels peptides hydrophobes. La radioactivité contenue dans chaque fraction CLHP (45 minutes/cycle) est quantifiée à l'aide du compteur β . A l'issue du séquençage, le filtre est également récupéré puis compté.

Conclusion Générale

Le travail réalisé au cours de cette thèse a consisté à utiliser des outils chimiques (protéases chimiques, marqueurs de photoaffinité) afin d'étudier la structure et la dynamique du récepteur nicotinique (nAChR) de torpille.

Le récepteur nicotinique appartient, avec les récepteurs GABA_A, 5-HT₃ et glutamate notamment, à la grande famille des récepteurs canaux extracellulaires (LGIC ou Ligand Gated Ion Channel). Ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la transmission synaptique. Après liaison du neuromédiateur (acétylcholine pour le nAChR), le canal s'ouvre et rend la membrane temporairement perméante aux ions. En présence continue d'agoniste, le récepteur entre ensuite dans un état fermé réfractaire à toute stimulation : on parle de phénomène de désensibilisation.

Les nAChRs sont des pentamères composés de sous unités homologues qui s'arrangent symétriquement autour d'un axe perpendiculaire à la membrane. Ils sont présents à la fois dans le système central et le système périphérique. Les récepteurs nicotiques de type musculaire sont localisés de manière très dense dans les membranes post-synaptiques du myocyte (muscle strié squelettique) au niveau de la jonction neuromusculaire ou plaque motrice. L'activation de ces récepteurs par l'ACh se traduit par une initiation de la contraction musculaire. Ces nAChRs sont impliqués dans certaines maladies neuromusculaires comme *Myasthenia gravis* (maladie auto-immune causée par des anticorps dirigés contre les nAChRs) ou les syndromes myasténiques congénitaux CMS (maladie congénitale dont certaines sont dues à une mutation au niveau d'une sous-unité du nAChR). Contrairement à leurs homologues musculaires qui jouent un rôle pivot dans l'initiation de la contraction musculaire, les récepteurs neuronaux exercent plutôt une influence modulatrice sur le SNC. Cependant, étant donné leur implication dans de nombreuses maladies (Alzheimer, Parkinson, Schizophrénie, Syndrome de Tourette, Trouble du Déficit de l'Attention et de l'Hyperactivité ADHD...) et leur rôle de cible pharmaceutique (analgésie, neuroprotection, dépendance à la nicotine...), ils font l'objet de nombreuses études.

En raison de son abondance naturelle, le récepteur de torpille, de stœchiométrie $\alpha_2\beta\gamma\delta$, a permis d'obtenir des informations considérables sur la structure et la fonction de cette macromolécule pentamérique. Pour ces raisons, nous avons décidé de travailler pendant cette thèse avec ce récepteur issu des organes électriques de torpille.

Au début de cette thèse, on recensait un nombre impressionnant d'expériences dont le défi était d'établir la topologie, l'arrangement des sous-unités, puis les structures secondaire et tertiaire des protomères ou encore la topologie des sites de liaison. Malgré tout cela, une structure à haute résolution du nAChR manquait. Effectivement, seules les structures de

quelques protéines transmembranaires ont pu être résolues, les principaux obstacles rencontrés étant l'obtention de quantités suffisantes pour entreprendre des études structurales, et la cristallisation de ces protéines hydrophobes. Nous avons donc décidé d'isoler le domaine extracellulaire de la sous-unité α de *Torpedo marmorata* à l'aide de protéases chimiques de type [EDTA / Fe / H₂O₂]. Une production et une purification efficaces de ce fragment polypeptidique auraient permis d'entreprendre ensuite la cristallisation en vue de l'étude structurale par rayon X de ce peptide qui comprend le site de liaison de l'ACh. Cependant, la publication en Avril 2001 de la structure aux rayons X d'une protéine soluble (AChBP) homologue au domaine de liaison du nAChR a littéralement révolutionné la recherche dans ce domaine. Pour ce qui nous concerne, cette publication nous a conduit à abandonner ce projet de protéase chimique qui, quoique original, perdait de sa pertinence. À l'inverse, nous avons essayé de mettre à profit ces nouvelles données structurales pour tester plus en avant la dynamique conformationnelle de ce récepteur après activation par un agoniste.

Nous avons donc décidé de réactualiser un marqueur de photoaffinité décrit précédemment au laboratoire (AC5) et d'appliquer à ce ligand photosensible la technique de photomarquage dynamique. AC5 est une molécule qui possède un groupement cholinomimétique (nécessaire à sa reconnaissance dans les sites acétylcholine) et un groupement aryldiazonium (fonction photosensible très réactive), séparés par un bras espaceur flexible.

Dans un premier temps, il a fallu remettre au point les synthèses non marquée d'AC5 et radiomarkée de [³H]AC5. Cette nouvelle méthodologie de synthèse nous a permis d'augmenter considérablement les rendements, tout en diminuant les étapes et le temps de production. L'ensemble de ces premiers résultats a fait l'objet d'un article (Mourot et al., 2002).

Nous avons par la suite caractérisé d'un point de vue pharmacologique la sonde AC5. En premier lieu nous avons observé une dégradation d'AC5 en présence des membranes riches en nAChR. Cette hydrolyse est réalisée par l'acétylcholinestérase (AChE), enzyme présente en quantité minime mais non négligeable dans la préparation membranaire riche en nAChRs. Nous avons donc mis au point un protocole nous permettant d'inhiber l'AChE sans interférer avec les propriétés fonctionnelles du nAChR. Nous avons ensuite mesuré l'affinité d'AC5 pour les sites agonistes (expériences de compétition et saturation) et pour le site canal du nAChR. AC5 se lie avec une très haute affinité aux sites agonistes (10⁻⁸ M) et avec une

très bonne sélectivité par rapport au site canal (300 μ M). Par ailleurs, nous avons vérifié que son affinité pour le site agoniste était bien due à sa fonction cholinomimétique.

Nous nous sommes ensuite intéressés au marquage du nAChR sous un état thermodynamiquement stable : l'état désensibilisé. Cet état peut être atteint facilement en incubant le nAChR avec un bloquant du canal : le proadifène. Sous cet état, AC5 s'incorpore de manière spécifique préférentiellement sur les sous-unités γ et δ , avec une incorporation mineure sur α , dans un rapport 55/42/3 respectivement. Ce marquage est protégeable (70 – 80 %) par 100 μ M de carbamylcholine sur les trois sous-unités. Une protection sélective du marquage nous a permis de confirmer la sélectivité de la d-tubocurarine et de l'épiibatidine pour le site $\alpha\gamma$, mais aussi de montrer la sélectivité du décaméthonium pour le site $\alpha\gamma$.

Afin d'analyser plus en détail le marquage, nous avons construit, avec l'aide du Laboratoire de Bioinformatique du Médicament (Faculté de Pharmacie, Illkirch), un modèle moléculaire du nAChR de torpille d'après la structure de l'AChBP. AC5 a ensuite été docké dans ce modèle. Ce docking positionne la partie photosensible d'AC5 en contact avec les sous-unités γ et δ du nAChR, en accord avec le profil de marquage. Ce modèle pourrait même apporter une explication à la différence de photomarquage sur γ et δ : la cavité supérieure du site serait plus étroite dans le cas d' $\alpha\gamma$.

Nous avons ensuite étudié l'incorporation d'AC5 sur le nAChR en fonction du temps de mélange entre ces deux partenaires. AC5 et le nAChR sont incubés pendant un temps choisi (de 17 ms à 1h15) à l'obscurité, puis le complexe est irradié pendant un temps très court (< 30 ms) avant d'être analysé. Pendant l'incubation à l'obscurité, le nAChR va donc pouvoir subir les transitions allostériques (ouverture et désensibilisation du canal) et le flash lumineux nous permet de quencher (photographier) le complexe. Afin de contrôler le temps de mélange à l'obscurité entre le nAChR et AC5, nous disposons d'un appareil de mélange rapide couplé à une lampe sodium de haute énergie. De manière surprenante, à des temps très courts (< 1 s), AC5 s'incorpore majoritairement sur les sous-unités α et γ , et minoritairement sur δ (proportions environ 55/40/5) avec un rendement faible (< 1%). À des temps de mélange supérieurs à 300 s, AC5 s'incorpore majoritairement sur les sous-unités γ et δ , et minoritairement sur α , dans des proportions et des rendements proches de ceux obtenus pour le marquage à l'équilibre sous l'état désensibilisé (proportion 55/42/3 respectivement, 6-7 % de rendement). AC5 est donc une sonde qui nous a permis de topographier l'environnement du site agoniste au cours de la désensibilisation. D'après ces résultats nous proposons un modèle dans lequel les cinq sous-unités subiraient des rotations concertées, ce qui conduirait

les sites agoniste à se refermer (ce qui explique l'augmentation de l'affinité des agonistes sous l'état désensibilisé) et les sous-unités complémentaires γ et δ à se rapprocher du ligand. Ces résultats font l'objet d'une publication en préparation. Afin d'accorder plus de poids à ce modèle, il est cependant nécessaire de vérifier le caractère agoniste d'AC5 pour le nAChR de torpilles. Ce travail est en cours de réalisation au laboratoire de Daniel Bertrand, CMU, Genève.

Nous avons ensuite tenté d'analyser plus en détail les résidus marqués par AC5 en irradiant de grandes quantités de nAChR, dans un premier temps sous l'état désensibilisé thermodynamiquement stable. Nous avons, dans ce but, mis au point une stratégie de protéolyse « in gel » des sous-unités δ et γ du nAChR par l'endoprotéase V8. Les peptides issus de protéolyse ont ensuite été purifiés par CLHP, ce qui nous a permis d'isoler deux fractions radioactives majoritaires pour chaque sous-unité. Ces fractions ont été analysées par MALDI-TOF (en collaboration avec le laboratoire de Réponse Immunitaire et Développement chez les Insectes, IBMC, Strasbourg). Une deuxième purification par CLHP suivie d'une analyse MALDI-TOF a été nécessaire avant de séquencer les peptides. Malheureusement, aucune fraction ne nous a permis d'identifier sans ambiguïté les peptides et/ou résidus alkylés par AC5. Ces expériences vont être poursuivies au laboratoire dans les prochaines semaines.

Annexes

Abréviations	155
Références bibliographiques	158
Sites internet d'intérêt	183
Articles Scientifiques	184

Abréviations

Acides aminés :

Ala : A : alanine
Cys : C : cystéine
Asp : D : acide aspartique
Glu : E : acide glutamique
Phe : F : phénylalanine
Gly : G : glycine
His : H : histidine
Ile : I : isoleucine
Lys : K : lysine
Leu : L : leucine

Met : M : méthionine
Asn : N : asparagine
Pro : P : proline
Gln : Q : glutamine
Arg : R : arginine
Ser : S : sérine
Thr : T : thréonine
Val : V : valine
Trp : W : tryptophane
Tyr : Y : tyrosine

Autres abréviations :

5-HT : 5-hydroxytryptamine (sérotonine)

5-HTR : récepteur à la sérotonine

A β ₁₋₄₂ : amyloïde- β 1-42

AC5 : agoniste en C₅

ACh : acétylcholine

AChBP : acetylcholine binding protein

AChE : acétylcholinestérase

AcOH : acide acétique

ADHD : Attention Deficit and Hyperactivity Disorder

AMPA : acide (*R,S*)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionique

AS : activité spécifique

ATP : adénosine tri-phosphate

ATR-FTIR : Attenuated total reflection Fourier transform infrared

α -BgTx : α -bungarotoxine

BNC : bloquant non compétitif du canal

BrACh : bromoacétylcholine

BrCN : bromure de cyanogène

BSA : albumine sérique bovine

Bz₂Ch : benzoylbenzoylcholine

CBPP : cholesteryl benzoylphenyl propionate

α -CbTx : α -cobratoxine

CCh : carbamylcholine

Ch : choline

ChAT : choline acétyltransférase

CLHP : chromatographie liquide à haute pression (ou performance)

CMS : syndrome myasthénique congénital

DAB : 3, 3' diamino benzidine

DAF : diazofluorene
 DCTA : (4-diazocyclohexa-2,5-diènoylpropyl)-triméthylammonium
 DDF : *p*-(*N,N*-diméthyl) aminobenzènediazonium fluoroborate
 DEAE : diéthylamino-éthyl
 DIFP : diisopropyl phosphofluoridate
 dM : décaméthonium
 Dns-C₆-Ch : dansyl-C₆-choline
 dpm : désintégration par minute
 dTC : d-tubocurarine (curare)
 DTT : dithiothréitol
 ECP-MS : Electrophysiology coordinated photolabeling with subsequent mass spectrometry
 EPB : épibatidine
 EXP : exported protein
 FCCMS : Fast Channel Congenital Myasthenic Syndrome
 Fe-BABE : (p-bromoacetamidobenzyl)-EDTA·Fe
 FTIR : infra-rouge à transformée de Fourier
 GABA : acide γ -aminobutyrique
 GPI : glycosylated phosphatidylinositol
 HCCA : acide α -cyano-hydroxycinnamique
 HEPES : acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
 K_d : constante de dissociation
 kDa : kilodalton
 K_i : constante d'inhibition
 KNF : Koshland, Nemethy Filmer
 KO : knock out
 K_p : constante de protection
 KYNA : acide kynurénique
 LGIC : ligand gated ion channel
 M1-M4 : segments transmembranaires 1 à 4
 mAChR : récepteur muscarinique de l'acétylcholine
 MBTA : 4-(N-maleimido) benzyltriméthylammonium

MC₃BE : Maleimido C₃ benzyl EDTA
 MC₅BE : Maleimido C₅ benzyl EDTA
 M.E. : microscopie électronique
 MeOH : méthanol
 MIR : main immunogenic region
 M_{max} : photoincorporation spécifique maximale
 M_{NS} : photoincorporation non-spécifique
 MOD : modulation of locomotion defective
 MPTA : 4-(N-maleimido) phenyltrimethylammonium
 M_{spé} : photoincorporation spécifique
 M_{tot} : photoincorporation totale
 MTSEA : aminoethylmethanethiosulfonate
 MTSET : [2-(trimethylammonium) ethyl]methanethiosulfonate
 MTSMT : methanethiosulfonate-methyltrimethylammonium
 MTSPT : 3-trimethylammoniumpropyl methanethiosulfonate
 MWC : Monod Wyman Changeux
 nAChR : récepteur nicotinique de l'acétylcholine
 n_H : nombre de Hill
 NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
 PCP : phencyclidine
 PDB : protein data bank
 PEI : polyéthylène-imine
 PGE₂ : prostaglandine E₂
 PH5 : produit d'hydrolyse d'AC5
 PKA : Protéine kinase A
 PM : poids moléculaire
 PMSF : phenyl methyl sulfonyl fluoride
 PP5 : produit de photolyse d'AC5
 PVDF : polyvinylidene difluoride
 RAPSIN : Receptor Associated Protein of the Synapse
 RCPG : récepteurs couplés aux protéines G

RMN : résonance magnétique nucléaire
 SCAM : substituted cysteine accessibility method
 SCCMS : Slow Channel Congenital Myasthenic Syndrome
 SDS : dodécyl sulfate de sodium
 SNC : système nerveux central
 TDBzCh : 4[(3-fluorométhyl)diazirine-3-yl]benzoylcholine
 TDF : p-(triméthyl ammonium) benzene diazonium difluoroborate
 TFA : acide trifluoroacétique
 TID : 3-(trifluorométhyl)-3-phenyldiazirine
 TIDBAc : 4'-(3-trifluorométhyl-diazirine-3-yl)-2'-tributylstannylbenzyl acetate
 TID-BE : 4-(trifluorométhyl-diazirine-3-yl)benzyl benzoate
 TIDBTMAc : 4'-(3-trifluorométhyl-3*H*-diazirine-3-yl)-2'-tributylstannylbenzyl triméthyl acetate
 TID-PC/16 : *O*-hexadecanoyl-2-*O*-[9-[[[4-(trifluorométhyl-diazirine-3-yl)benzyl]oxy]carbonyl]nonanoyl]-*sn*-glycero-3-phosphocholine
 TPMP⁺ : triphenyl-méthylphosphonium
 TREF : transfert résonant d'énergie de fluorescence
 UV : ultraviolet
 VAChT : vesicular acetylcholine transporter
 VIP : polypeptide intestinal vasoactif
 ZAC : zinc activated ion channel

(Absalom et al., 2004; Ahern & Horn, 2004; Avramopoulou et al., 2004; Bouzat et al., 2004; Celie et al., 2004; Chakrapani et al., 2004; Chou, 2004; Colquhoun & Sivilotti, 2004; Connolly & Wafford, 2004; Doyle, 2004; Dutertre et al., 2004; Dutzler, 2004; Espinoza-Fonseca, 2004; Faller et al., 2004; Ferreira et al., 2004; Hansen et al., 2004; Jones & Sattelle, 2004; Kotzyba-Hibert et al., 2004; Lester et al., 2004; Liu et al., 2004; Nirthanan & Gwee, 2004; Price & Lummis, 2004; Severance et al., 2004; Sine et al., 2004; Sukharev & Anishkin, 2004; Taylor et al., 2004; Tierney et al., 2004; Tonini et al., 2004; Van den Berg et al., 2004; Webster et al., 2004; Williamson et al., 2004)

(Abramson et al., 2003; Absalom et al., 2003; Beene et al., 2003; Beg & Jorgensen, 2003; Boue-Grabot et al., 2003; Caffrey, 2003; Chakrapani et al., 2003; Champiaux et al., 2003; Chiara et al., 2003; Chiara et al., 2003; Conroy et al., 2003; Costa et al., 2003; Davies et al., 2003; Dougherty et al., 2003; Engel et al., 2003; Fu & Jhamandas, 2003; Grassi et al., 2003; Grutter et al., 2003; Hosie et al., 2003; Huang et al., 2003; Huebsch & Maimone, 2003; Jiang et al., 2003; Jones et al., 2003; Karnovsky et al., 2003; Kash et al., 2003; Kelley et al., 2003; Kuo et al., 2003; Kurisu et al., 2003; Leite et al., 2003; Maksay et al., 2003; Millar, 2003; Miyazawa et al., 2003; Mu et al., 2003; Nevin et al., 2003; Pebay-Peyroula et al., 2003; Reeves et al., 2003; Rozycka & Trzeciak, 2003; Shen et al., 2003; Smit et al., 2003; Song et al., 2003; Stroebel et al., 2003; Unwin, 2003; Yankovskaya et al., 2003; Yu et al., 2003; Yushmanov et al., 2003)

(Abdrakhmanova et al., 2002; Bass et al., 2002; Beene et al., 2002; Bera et al., 2002; Buisson & Bertrand, 2002; Butt et al., 2002; Champiaux & Changeux, 2002; Cromer et al., 2002; Curtis et al., 2002; Cymes et al., 2002; Dineley et al., 2002; Dutzler et al., 2002; Fruchart-Gaillard et al., 2002; Fu et al., 2002; Garbus et al., 2002; Gisselmann et al., 2002; Grutter et al., 2002; Hansen et al., 2002; Hatanaka & Sadakane, 2002; Ibanez-Tallon et al., 2002; Jiang et al., 2002; Jiang et al., 2002; Jormakka et al., 2002; Karlin, 2002; Karpen & Ruiz, 2002; Keramidas et al., 2002; Khiroug et al., 2002; Le Novere et al., 2002; Le Novere et al., 2002; Lee et al., 2002; Lindstrom, 2002; Locher et al., 2002; Loudwig et al., 2002; Moise et al., 2002; Molles et al., 2002; Montal & Opella, 2002; Mourot et al., 2002; Murakami et al., 2002; Nishida & MacKinnon, 2002; Pereira et al., 2002; Petersson et al., 2002; Psaridi-Linardaki et al., 2002; Quick & Lester, 2002; Schapira et al., 2002; Sgard et al., 2002; Sine et al., 2002; Steinlein, 2002; Sullivan et al., 2002; Trudell, 2002; Tsetlin et al., 2002; Unwin et al., 2002; Valor et al., 2002; Yao et al., 2002; Zacharias & Dougherty, 2002)

(Arias et al., 2001; Bixel et al., 2001; Bohler et al., 2001; Brejc et al., 2001; Chang & Roth, 2001; Davare et al., 2001; Dougherty & Lester, 2001; Du & Role, 2001; Elgoyhen et al., 2001; Fischer et al., 2001; Foucaud et al., 2001; Gallagher et al., 2001; Grosman & Auerbach, 2001; Grutter & Changeux, 2001; Gunthorpe & Lummis, 2001; Harel et al., 2001; Horenstein et al., 2001; Hsiao et al., 2001; Jordan et al., 2001; Klink et al., 2001; Kramer et al., 2001; Liu et al., 2001; Luecke et al., 2001; Mayer et al., 2001; Methot et al., 2001; Papineni et al., 2001; Smit et al., 2001; Sokolova et al., 2001; Takacs et al., 2001; Wagner & Czajkowski, 2001; Wilson & Karlin, 2001; Zouni et al., 2001)

(Arias, 2000; Armstrong & Gouaux, 2000; Baenziger et al., 2000; Balestra et al., 2000; Barrantes et al., 2000; Cordero-Erausquin et al., 2000; Corringer et al., 2000; Drisdell & Green, 2000; Grosman & Auerbach, 2000; Grosman et al., 2000; Grosman et al., 2000; Grutter et al., 2000; Keramidas et al., 2000; Khakh et al., 2000; Kleinjung et al., 2000; Kolbe et al., 2000; Koronakis et al., 2000; Kunishima et al., 2000; Kuryatov et al., 2000; Liu et al., 2000; Liu et al., 2000; Maelicke et al., 2000; Martinez et al., 2000; Murata et al., 2000; Palczewski et al., 2000; Pratt et al., 2000; Pratt et al., 2000; Ranganathan et al., 2000; Song & Pedersen, 2000; Sullivan & Cohen,

2000; Tamamizu et al., 2000; Tierney & Unwin, 2000; Toyoshima et al., 2000; Wang et al., 2000; Wang et al., 2000; Wang et al., 2000; Zwart et al., 2000)

(Akk et al., 1999; Alexeev et al., 1999; Blanton et al., 1999; Chang & Weiss, 1999; Chiara et al., 1999; Corringer et al., 1999; England et al., 1999; Gallagher & Cohen, 1999; Girod et al., 1999; Grant et al., 1999; Iverson et al., 1999; Lancaster et al., 1999; Le Novere et al., 1999; Lena et al., 1999; Michalski & Shiell, 1999; Middleton et al., 1999; Miyazawa et al., 1999; Opella et al., 1999; Palma et al., 1999; Pashkov et al., 1999; Reitstetter et al., 1999; Spura et al., 1999; Stock et al., 1999; Vailati et al., 1999)

(Arias, 1998; Armstrong et al., 1998; Auerbach & Akk, 1998; Blanton et al., 1998; Blanton et al., 1998; Chang et al., 1998; Changeux & Edelstein, 1998; Chiara et al., 1998; Colquhoun, 1998; Corbin et al., 1998; Corbin et al., 1998; Corringer et al., 1998; Doyle et al., 1998; Engel et al., 1998; Ferguson et al., 1998; Forst et al., 1998; Fucile et al., 1998; Groot-Kormelink et al., 1998; Iwata et al., 1998; Karlin & Akabas, 1998; Kim & McNamee, 1998; Krause et al., 1998; Lugovskoy et al., 1998; Nachon et al., 1998; Prince & Sine, 1998; Raines & Krishnan, 1998; Schrattenholz et al., 1998; Shao et al., 1998; Unwin, 1998; Wells et al., 1998; Whittaker, 1998; Zhang & Karlin, 1998; Zhong et al., 1998)

(Autelitano et al., 1997; Bertrand et al., 1997; Chen & Patrick, 1997; Chiara & Cohen, 1997; Croxen et al., 1997; Edelstein et al., 1997; Forsayeth & Kobrin, 1997; Fucile et al., 1997; Gerzanich et al., 1997; Kotzyba-Hibert et al., 1997; Milone et al., 1997; Ohno et al., 1997; Olale et al., 1997; Pebay-Peyroula et al., 1997; Ruiz & Karpen, 1997; Schrattenholz et al., 1997; Wang et al., 1997; Watty et al., 1997; West et al., 1997; Xia et al., 1997; Zhang & Karlin, 1997)

(Bouzat & Barrantes, 1996; Campos-Caro et al., 1996; Clements, 1996; Dougherty, 1996; Edelstein et al., 1996; Engel et al., 1996; Galzi et al., 1996; Gomez et al., 1996; Jones & Westbrook, 1996; Martin et al., 1996; Ohno et al., 1996; Prince & Sine, 1996; Ramirez-Latorre et al., 1996; Role & Berg, 1996; Ryan et al., 1996; Schrattenholz et al., 1996; Song et al., 1996; Tsukihara et al., 1996; Wang et al., 1996)

(Chen et al., 1995; Conroy & Berg, 1995; Corringer et al., 1995; Czajkowski & Karlin, 1995; Dudel & Franke, 1995; Galzi & Changeux, 1995; Gill et al., 1995; Gundelfinger, 1995; Iwata et al., 1995; Kotzyba-Hibert et al., 1995; Le Novere & Changeux, 1995; Machold et al., 1995; Margiotta & Pardi, 1995; McLaughlin et al., 1995; Mileo et al., 1995; Moore & McCarthy, 1995; Nowak et al., 1995; Ohno et al., 1995; Ortells & Lunt, 1995; Schirmer et al., 1995; Sine et al., 1995; Sine et al., 1995; Spivak, 1995; Storch et al., 1995; Swope et al., 1995; Unwin, 1995)

(Anand et al., 1993; Bertrand et al., 1993; Czajkowski et al., 1993; Eisele et al., 1993; Horton et al., 1993; Keyser et al., 1993; Maimone & Merlie, 1993; Min & Weiland, 1993; Naranjo & Brehm, 1993; Pereira et al., 1993; Schrattenholz et al., 1993; Sine, 1993; Unwin, 1993; Akabas et al., 1994; Blanton & Cohen, 1994; Blanton et al., 1994; Bouzat et al., 1994; Combeau et al., 1994; Cully et al., 1994; Elgoyhen et al., 1994; Gotti et al., 1994; Hsu, 1994; Kienker et al., 1994; Min et al., 1994; O'Leary et al., 1994; Schalk et al., 1994; Sine et al., 1994; Stafford et al., 1994; Valenzuela et al., 1994)

(Langley, 1906; Langley, 1907; Dale, 1914; Feldberg, 1940; Katz & Thesleff, 1957; Bartels, 1965; Monod et al., 1965; Koshland et al., 1966; Eigen, 1968; Changeux et al., 1970; Cohen et al., 1972; Schmidt & Raftery, 1973; Weber & Changeux, 1974; Weber & Changeux, 1974; Brown & Kwiatkowski, 1976; Chang & Neumann, 1976; Neher & Sakmann, 1976; Waksman et al., 1976; Peterson, 1977; Adams & Sakmann, 1978; Damle & Karlin, 1978; Damle et al., 1978; Heidmann & Changeux, 1979; Neubig & Cohen, 1979; Neubig et al., 1979; Weiland et al., 1979; Boyd & Cohen, 1980; Damle & Karlin, 1980; Goeldner & Hirth, 1980; Heidmann & Changeux, 1980; Saitoh & Changeux, 1980; Eldefrawi et al., 1982; Giraudat et al., 1982; Noda et al., 1982;

Auerbach & Sachs, 1983; Claudio et al., 1983; Devillers-Thiery et al., 1983; Goeldner et al., 1983; Heidmann et al., 1983; Heidmann et al., 1983; Noda et al., 1983; Noda et al., 1983; Boyd & Cohen, 1984; Changeux et al., 1984; Heidmann & Changeux, 1984; Johnson et al., 1984; Kao et al., 1984; Popot & Changeux, 1984; Colquhoun & Sakmann, 1985; Giraudat et al., 1985; Shaw et al., 1985; Dreyer et al., 1986; Giraudat et al., 1986; Heidmann & Changeux, 1986; Hucho et al., 1986; Imoto et al., 1986; Kieffer et al., 1986; Mishina et al., 1986; Oberthur et al., 1986; Simasko et al., 1986; Giraudat et al., 1987; Grenningloh et al., 1987; Kubalek et al., 1987; Lippiello et al., 1987; McCrea et al., 1987; Schofield et al., 1987; Simasko et al., 1987; Dennis et al., 1988; Gu & Hall, 1988; Igusa, 1988; Imoto et al., 1988; Langenbuch-Cachat et al., 1988; Leonard et al., 1988; Oberthur & Hucho, 1988; Abramson et al., 1989; Blount & Merlie, 1989; DiPaola et al., 1989; Duvoisin et al., 1989; Giraudat et al., 1989; Marquez et al., 1989; Mitra et al., 1989; Noren et al., 1989; Ochoa et al., 1989; Papke et al., 1989; Rozental et al., 1989; Chatrenet, 1990; Couturier et al., 1990; Dougherty & Stauffer, 1990; Galzi et al., 1990; Kessler et al., 1990; Li et al., 1990; Pedersen & Cohen, 1990; Revah et al., 1990; Albuquerque et al., 1991; Cohen et al., 1991; Cooper et al., 1991; Czajkowski & Karlin, 1991; Galzi et al., 1991; Galzi et al., 1991; Imoto et al., 1991; Klotz et al., 1991; Konno et al., 1991; Kuhlmann et al., 1991; Leonard et al., 1991; Maricq et al., 1991; Middleton & Cohen, 1991; Okonjo et al., 1991; Rana & Meares, 1991; Revah et al., 1991; Sussman et al., 1991; Tzartos et al., 1991; Villarroel et al., 1991; Bertrand et al., 1992; Blanton & Cohen, 1992; Chatrenet et al., 1992; Cohen et al., 1992; Cowan et al., 1992; Devillers-Thiery et al., 1992; Flores et al., 1992; Galzi et al., 1992; Matsubara et al., 1992; Mozrzymas & Ruzzier, 1992; Mülle et al., 1992; Pedersen et al., 1992; Rosenfeld et al., 1992; Valera et al., 1992; Vernino et al., 1992; Villarroel & Sakmann, 1992; White & Cohen, 1992)

Références bibliographiques

A

- Abdrakhmanova G, Dorfman J, Xiao Y, Morad M. 2002. Protons enhance the gating kinetics of the $\alpha 3/\beta 4$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by increasing its apparent affinity to agonists. *Mol Pharmacol* 61:369-378.
- Abramson J, Smirnova I, Kasho V, Verner G, Kaback HR, Iwata S. 2003. Structure and mechanism of the lactose permease of *Escherichia coli*. *Science* 301:610-615.
- Abramson SN, Li Y, Culver P, Taylor P. 1989. An analog of lophotoxin reacts covalently with Tyr190 in the α -subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 264:12666-12672.
- Absalom NL, Lewis TM, Kaplan W, Pierce KD, Schofield PR. 2003. Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* 278:50151-50157.
- Absalom NL, Lewis TM, Schofield PR. 2004. Mechanisms of channel gating of the ligand-gated ion channel superfamily inferred from protein structure. *Exp Physiol* 89:145-153.
- Adams PR, Sakmann B. 1978. Decamethonium both opens and blocks endplate channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:2994-2998.
- Ahern CA, Horn R. 2004. Stirring up controversy with a voltage sensor paddle. *Trends Neurosci* 27:303-307.
- Akabas MH, Kaufmann C, Archdeacon P, Karlin A. 1994. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit. *Neuron* 13:919-927.
- Akk G, Zhou M, Auerbach A. 1999. A mutational analysis of the acetylcholine receptor channel transmitter binding site. *Biophys J* 76:207-218.
- Albuquerque EX, Costa AC, Alkondon M, Shaw KP, Ramoa AS, Aracava Y. 1991. Functional properties of the nicotinic and glutamatergic receptors. *J Recept Res* 11:603-625.
- Alexeev T, Krivoshein A, Shevalier A, Kudelina I, Telyakova O, Vincent A, Utkin Y, Hucho F, Tsetlin V. 1999. Physicochemical and immunological studies of the N-terminal domain of the Torpedo acetylcholine receptor α -subunit expressed in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 259:310-319.
- Anand R, Peng X, Ballesta JJ, Lindstrom J. 1993. Pharmacological characterization of α -bungarotoxin-sensitive acetylcholine receptors immunoisolated from chick retina: contrasting properties of $\alpha 7$ and $\alpha 8$ subunit-containing subtypes. *Mol Pharmacol* 44:1046-1050.
- Arias HR. 1998. Binding sites for exogenous and endogenous non-competitive inhibitors of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1376:173-220.
- Arias HR. 2000. Localization of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochem Int* 36:595-645.
- Arias HR, McCardy EA, Gallagher MJ, Blanton MP. 2001. Interaction of barbiturate analogs with the Torpedo californica nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *Mol Pharmacol* 60:497-506.
- Armstrong N, Sun Y, Chen GQ, Gouaux E. 1998. Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature* 395:913-917.

- 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.
- Auerbach A, Sachs F. 1983. Flickering of a nicotinic ion channel to a subconductance state. *Biophys J* 42:1-10.
- Auerbach A, Akk G. 1998. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *J Gen Physiol* 112:181-197.
- Autelitano F, Weill C, Goeldner M, Ilien B. 1997. Covalent labeling of muscarinic acetylcholine receptors by tritiated aryldiazonium photoprobes. *Biochem Pharmacol* 53:501-510.
- Avramopoulou V, Mamalaki A, Tzartos SJ. 2004. Soluble, oligomeric and ligand-binding extracellular domain of human $\alpha 7$ acetylcholine receptor expressed in yeast. Replacement of the hydrophobic Cys-loop by the hydrophilic loop of ACh-binding protein enhances protein solubility. *J Biol Chem*.

B

- Baenziger JE, Morris ML, Darsaut TE, Ryan SE. 2000. Effect of membrane lipid composition on the conformational equilibria of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 275:777-784.
- Balestra B, Vailati S, Moretti M, Hanke W, Clementi F, Gotti C. 2000. Chick optic lobe contains a developmentally regulated $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nicotinic receptor subtype. *Mol Pharmacol* 58:300-311.
- Barrantes FJ, Antollini SS, Blanton MP, Prieto M. 2000. Topography of nicotinic acetylcholine receptor membrane-embedded domains. *J Biol Chem* 275:37333-37339.
- Bartels E. 1965. Relationship between acetylcholine and local anesthetics. *Biochim Biophys Acta* 109:194-203.
- Bass RB, Strop P, Barclay M, Rees DC. 2002. Crystal structure of *Escherichia coli* MscS, a voltage-modulated and mechanosensitive channel. *Science* 298:1582-1587.
- Beene DL, Brandt GS, Zhong W, Zacharias NM, Lester HA, Dougherty DA. 2002. Cation- π interactions in ligand recognition by serotonergic (5-HT_{3A}) and nicotinic acetylcholine receptors: the anomalous binding properties of nicotine. *Biochemistry* 41:10262-10269.
- Beene DL, Dougherty DA, Lester HA. 2003. Unnatural amino acid mutagenesis in mapping ion channel function. *Curr Opin Neurobiol* 13:264-270.
- Beg AA, Jorgensen EM. 2003. EXP-1 is an excitatory GABA-gated cation channel. *Nat Neurosci* 6:1145-1152.
- Bera AK, Chatav M, Akabas MH. 2002. GABA(A) receptor M2-M3 loop secondary structure and changes in accessibility during channel gating. *J Biol Chem* 277:43002-43010.
- Bertrand D, Devillers-Thiery A, Revah F, Galzi JL, Hussy N, Mulle C, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1992. Unconventional pharmacology of a neuronal nicotinic receptor mutated in the channel domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1261-1265.
- Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Bertrand S, Changeux JP. 1993. Mutations at two distinct sites within the channel domain M2 alter calcium permeability of neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6971-6975.
- Bertrand S, Devillers-Thiery A, Palma E, Buisson B, Edelstein SJ, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D. 1997. Paradoxical allosteric effects of competitive inhibitors on neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptor mutants. *Neuroreport* 8:3591-3596.

- Bixel MG, Weise C, Bolognesi ML, Rosini M, Brierly MJ, Mellor IR, Usherwood PN, Melchiorre C, Hucho F. 2001. Location of the polyamine binding site in the vestibule of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *J Biol Chem* 276:6151-6160.
- Blanton MP, Cohen JB. 1992. Mapping the lipid-exposed regions in the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 31:3738-3750.
- Blanton MP, Cohen JB. 1994. Identifying the lipid-protein interface of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor: secondary structure implications. *Biochemistry* 33:2859-2872.
- Blanton MP, Li YM, Stimson ER, Maggio JE, Cohen JB. 1994. Agonist-induced photoincorporation of a p-benzoylphenylalanine derivative of substance P into membrane-spanning region 2 of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor delta subunit. *Mol Pharmacol* 46:1048-1055.
- Blanton MP, Dangott LJ, Raja SK, Lala AK, Cohen JB. 1998. Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel with the uncharged photoactivable compound -3H-diazofluorene. *J Biol Chem* 273:8659-8668.
- Blanton MP, McCardy EA, Huggins A, Parikh D. 1998. Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with the hydrophobic photoreactive probes [125I]TID-BE and [125I]TIDPC/16. *Biochemistry* 37:14545-14555.
- Blanton MP, Xie Y, Dangott LJ, Cohen JB. 1999. The steroid promegestone is a noncompetitive antagonist of the *Torpedo* nicotinic acetylcholine receptor that interacts with the lipid-protein interface. *Mol Pharmacol* 55:269-278.
- Blount P, Merlie JP. 1989. Molecular basis of the two nonequivalent ligand binding sites of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 3:349-357.
- Bohler S, Gay S, Bertrand S, Corringer PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. 2001. Desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors conferred by N-terminal segments of the beta 2 subunit. *Biochemistry* 40:2066-2074.
- Boue-Grabot E, Barajas-Lopez C, Chakfe Y, Blais D, Belanger D, Emerit MB, Seguela P. 2003. Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. *J Neurosci* 23:1246-1253.
- Bouzat C, Bren N, Sine SM. 1994. Structural basis of the different gating kinetics of fetal and adult acetylcholine receptors. *Neuron* 13:1395-1402.
- Bouzat C, Barrantes FJ. 1996. Modulation of muscle nicotinic acetylcholine receptors by the glucocorticoid hydrocortisone. Possible allosteric mechanism of channel blockade. *J Biol Chem* 271:25835-25841.
- Bouzat C, Gumilar F, Spitzmaul G, Wang HL, Rayes D, Hansen SB, Taylor P, Sine SM. 2004. Coupling of agonist binding to channel gating in an ACh-binding protein linked to an ion channel. *Nature* 430:896-900.
- Boyd ND, Cohen JB. 1980. Kinetics of binding of [3H]acetylcholine and [3H]carbamoylcholine to *Torpedo* postsynaptic membranes: slow conformational transitions of the cholinergic receptor. *Biochemistry* 19:5344-5353.
- Boyd ND, Cohen JB. 1984. Desensitization of membrane-bound *Torpedo* acetylcholine receptor by amine noncompetitive antagonists and aliphatic alcohols: studies of [3H]acetylcholine binding and 22Na⁺ ion fluxes. *Biochemistry* 23:4023-4033.
- Brejck K, van Dijk WJ, Klaassen RV, Schuurmans M, van Der Oost J, Smit AB, Sixma TK. 2001. Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411:269-276.

- Brown DA, Kwiatkowski D. 1976. A note on the effect of dithiothreitol (DTT) on the depolarization of isolated sympathetic ganglia by carbachol and bromo-acetylcholine. *Br J Pharmacol* 56:128-130.
- Buisson B, Bertrand D. 2002. Nicotine addiction: the possible role of functional upregulation. *Trends Pharmacol Sci* 23:130-136.
- Butt CM, Hutton SR, Marks MJ, Collins AC. 2002. Bovine serum albumin enhances nicotinic acetylcholine receptor function in mouse thalamic synaptosomes. *J Neurochem* 83:48-56.

C

- Caffrey M. 2003. Membrane protein crystallization. *J Struct Biol* 142:108-132.
- Campos-Caro A, Sala S, Ballesta JJ, Vicente-Agullo F, Criado M, Sala F. 1996. A single residue in the M2-M3 loop is a major determinant of coupling between binding and gating in neuronal nicotinic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6118-6123.
- Case DA, Pearlman DA, Caldwell JW, Cheatham III TE, Wang J, Ross WS, Simmerling CL, Darden TA, Merz KM, Stanton RV, Cheng AL, Vincent JJ, Crowley M, Tsui V, Gohlke H, Radmer RJ, Duan Y, Pitera J, Massova I, Seibel GL, Singh UC, Weiner PK, Kollman PA. 2002. AMBER 7. In: University of California
- Celie PH, van Rossum-Fikkert SE, van Dijk WJ, Brejc K, Smit AB, Sixma TK. 2004. Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41:907-914.
- Chakrapani S, Bailey TD, Auerbach A. 2003. The role of loop 5 in acetylcholine receptor channel gating. *J Gen Physiol* 122:521-539.
- Chakrapani S, Bailey TD, Auerbach A. 2004. Gating dynamics of the acetylcholine receptor extracellular domain. *J Gen Physiol* 123:341-356.
- Champtiaux N, Changeux JP. 2002. Knock-out and knock-in mice to investigate the role of nicotinic receptors in the central nervous system. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:319-330.
- Champtiaux N, Gotti C, Cordero-Erausquin M, David DJ, Przybylski C, Lena C, Clementi F, Moretti M, Rossi FM, Le Novère N, McIntosh JM, Gardier AM, Changeux JP. 2003. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci* 23:7820-7829.
- Chang G, Spencer RH, Lee AT, Barclay MT, Rees DC. 1998. Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel. *Science* 282:2220-2226.
- Chang G, Roth CB. 2001. Structure of MscA from *E. coli*: a homolog of the multidrug resistance ATP binding cassette (ABC) transporters. *Science* 293:1793-1800.
- Chang HW, Neumann E. 1976. Dynamic properties of isolated acetylcholine receptor proteins: release of calcium ions caused by acetylcholine binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3364-3368.
- Chang Y, Weiss DS. 1999. Channel opening locks agonist onto the GABAC receptor. *Nat Neurosci* 2:219-225.
- 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.
- Changeux JP, Devillers-Thiery A, Chemouilli P. 1984. Acetylcholine receptor: an allosteric protein. *Science* 225:1335-1345.
- Changeux JP, Edelstein SJ. 1998. Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21:959-980.

- Chatrenet B. 1990. AcChoR / Etude Topographique. In:Strasbourg: ULP.
- Chatrenet B, Kotzba-Hibert F, Mulle C, Changeux JP, Goeldner MP, Hirth C. 1992. Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor. *Mol Pharmacol* 41:1100-1106.
- Chen D, Patrick JW. 1997. The alpha-bungarotoxin-binding nicotinic acetylcholine receptor from rat brain contains only the alpha7 subunit. *J Biol Chem* 272:24024-24029.
- Chen J, Zhang Y, Akk G, Sine S, Auerbach A. 1995. Activation kinetics of recombinant mouse nicotinic acetylcholine receptors: mutations of alpha-subunit tyrosine 190 affect both binding and gating. *Biophys J* 69:849-859.
- Chiara DC, Cohen JB. 1997. Identification of amino acids contributing to high and low affinity d-tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 272:32940-32950.
- Chiara DC, Middleton RE, Cohen JB. 1998. Identification of tryptophan 55 as the primary site of [3H]nicotine photoincorporation in the gamma-subunit of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* 423:223-226.
- Chiara DC, Xie Y, Cohen JB. 1999. Structure of the agonist-binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: affinity-labeling and mutational analyses identify gamma Tyr-111/delta Arg-113 as antagonist affinity determinants. *Biochemistry* 38:6689-6698.
- Chiara DC, Dangott LJ, Eckenhoff RG, Cohen JB. 2003. Identification of nicotinic acetylcholine receptor amino acids photolabeled by the volatile anesthetic halothane. *Biochemistry* 42:13457-13467.
- Chiara DC, Trinidad JC, Wang D, Ziebell MR, Sullivan D, Cohen JB. 2003. Identification of amino acids in the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site and ion channel photolabeled by 4-[(3-trifluoromethyl)-3H-diazirin-3-yl]benzoylcholine, a novel photoaffinity antagonist. *Biochemistry* 42:271-283.
- Chou KC. 2004. Insights from modelling the 3D structure of the extracellular domain of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 319:433-438.
- Claudio T, Ballivet M, Patrick J, Heinemann S. 1983. Nucleotide and deduced amino acid sequences of Torpedo californica acetylcholine receptor gamma subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:1111-1115.
- Clements JD. 1996. Transmitter timecourse in the synaptic cleft: its role in central synaptic function. *Trends Neurosci* 19:163-171.
- Cohen BN, Labarca C, Davidson N, Lester HA. 1992. Mutations in M2 alter the selectivity of the mouse nicotinic acetylcholine receptor for organic and alkali metal cations. *J Gen Physiol* 100:373-400.
- Cohen JB, Weber M, Huchet M, Changeux JP. 1972. Purification from Torpedo marmorata electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein. *FEBS Lett* 26:43-47.
- Cohen JB, Sharp SD, Liu WS. 1991. Structure of the agonist-binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. [3H]acetylcholine mustard identifies residues in the cation-binding subsite. *J Biol Chem* 266:23354-23364.
- Colquhoun D, Sakmann B. 1985. Fast events in single-channel currents activated by acetylcholine and its analogues at the frog muscle end-plate. *J Physiol* 369:501-557.
- Colquhoun D. 1998. Binding, gating, affinity and efficacy: the interpretation of structure-activity relationships for agonists and of the effects of mutating receptors. *Br J Pharmacol* 125:924-947.

- Colquhoun D, Sivilotti LG. 2004. Function and structure in glycine receptors and some of their relatives. *Trends Neurosci* 27:337-344.
- Combeau C, Commercon A, Mioskowski C, Rousseau B, Aubert F, Goeldner M. 1994. Predominant labeling of beta- over alpha-tubulin from porcine brain by a photoactivatable taxoid derivative. *Biochemistry* 33:6676-6683.
- Connolly CN, Wafford KA. 2004. The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32:529-534.
- Conroy WG, Berg DK. 1995. Neurons can maintain multiple classes of nicotinic acetylcholine receptors distinguished by different subunit compositions. *J Biol Chem* 270:4424-4431.
- Conroy WG, Liu QS, Nai Q, Margiotta JF, Berg DK. 2003. Potentiation of alpha7-containing nicotinic acetylcholine receptors by select albumins. *Mol Pharmacol* 63:419-428.
- Cooper E, Couturier S, Ballivet M. 1991. Pentameric structure and subunit stoichiometry of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Nature* 350:235-238.
- Corbin J, Methot N, Wang HH, Baenziger JE, Blanton MP. 1998. Secondary structure analysis of individual transmembrane segments of the nicotinic acetylcholine receptor by circular dichroism and Fourier transform infrared spectroscopy. *J Biol Chem* 273:771-777.
- Corbin J, Wang HH, Blanton MP. 1998. Identifying the cholesterol binding domain in the nicotinic acetylcholine receptor with [125I]azido-cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1414:65-74.
- Cordero-Erausquin M, Marubio LM, Klink R, Changeux JP. 2000. Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol Sci* 21:211-217.
- Corringer PJ, Galzi JL, Eisele JL, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. 1995. Identification of a new component of the agonist binding site of the nicotinic alpha 7 homooligomeric receptor. *J Biol Chem* 270:11749-11752.
- Corringer PJ, Bertrand S, Bohler S, Edelstein SJ, Changeux JP, Bertrand D. 1998. Critical elements determining diversity in agonist binding and desensitization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurosci* 18:648-657.
- Corringer PJ, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. 1999. Mutational analysis of the charge selectivity filter of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 22:831-843.
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP. 2000. Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431-458.
- Costa V, Nistri A, Cavalli A, Carloni P. 2003. A structural model of agonist binding to the alpha3beta4 neuronal nicotinic receptor. *Br J Pharmacol* 140:921-931.
- Couturier S, Bertrand D, Matter JM, Hernandez MC, Bertrand S, Millar N, Valera S, Barkas T, Ballivet M. 1990. A neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit (alpha 7) is developmentally regulated and forms a homo-oligomeric channel blocked by alpha-BTX. *Neuron* 5:847-856.
- Cowan SW, Schirmer T, Rummel G, Steiert M, Ghosh R, Pauptit RA, Jansonius JN, Rosenbusch JP. 1992. Crystal structures explain functional properties of two E. coli porins. *Nature* 358:727-733.
- Cromer BA, Morton CJ, Parker MW. 2002. Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci* 27:280-287.
- Croxen R, Newland C, Beeson D, Oosterhuis H, Chauplannaz G, Vincent A, Newsom-Davis J. 1997. Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum Mol Genet* 6:767-774.

- Cully DF, Vassilatis DK, Liu KK, Paress PS, Van der Ploeg LH, Schaeffer JM, Arena JP. 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channel from *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 371:707-711.
- Curtis L, Buisson B, Bertrand S, Bertrand D. 2002. Potentiation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol* 61:127-135.
- Cymes GD, Grosman C, Auerbach A. 2002. Structure of the transition state of gating in the acetylcholine receptor channel pore: a phi-value analysis. *Biochemistry* 41:5548-5555.
- Czajkowski C, Karlin A. 1991. Agonist binding site of Torpedo electric tissue nicotinic acetylcholine receptor. A negatively charged region of the delta subunit within 0.9 nm of the alpha subunit binding site disulfide. *J Biol Chem* 266:22603-22612.
- Czajkowski C, Kaufmann C, Karlin A. 1993. Negatively charged amino acid residues in the nicotinic receptor delta subunit that contribute to the binding of acetylcholine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:6285-6289.
- Czajkowski C, Karlin A. 1995. Structure of the nicotinic receptor acetylcholine-binding site. Identification of acidic residues in the delta subunit within 0.9 nm of the 5 alpha subunit-binding. *J Biol Chem* 270:3160-3164.

D

- Dale H. 1914. The action of certain esters of choline, and their relation to muscarine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 6:147-190.
- Damle VN, Karlin A. 1978. Affinity labeling of one of two alpha-neurotoxin binding sites in acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochemistry* 17:2039-2045.
- Damle VN, McLaughlin M, Karlin A. 1978. Bromoacetylcholine as an affinity label of the acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochem Biophys Res Commun* 84:845-851.
- Damle VN, Karlin A. 1980. Effects of agonists and antagonists on the reactivity of the binding site disulfide in acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochemistry* 19:3924-3932.
- Davare MA, Avdonin V, Hall DD, Peden EM, Burette A, Weinberg RJ, Horne MC, Hoshi T, Hell JW. 2001. A beta2 adrenergic receptor signaling complex assembled with the Ca^{2+} channel Cav1.2. *Science* 293:98-101.
- Davies PA, Wang W, Hales TG, Kirkness EF. 2003. A novel class of ligand-gated ion channel is activated by Zn^{2+} . *J Biol Chem* 278:712-717.
- Dennis M, Giraudat J, Kotzyba-Hibert F, Goeldner M, Hirth C, Chang JY, Lazure C, Chretien M, Changeux JP. 1988. Amino acids of the Torpedo marmorata acetylcholine receptor alpha subunit labeled by a photoaffinity ligand for the acetylcholine binding site. *Biochemistry* 27:2346-2357.
- Devillers-Thiery A, Giraudat J, Bentaboulet M, Changeux JP. 1983. Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding alpha-subunit of Torpedo marmorata acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:2067-2071.
- Devillers-Thiery A, Galzi JL, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. 1992. Stratified organization of the nicotinic acetylcholine receptor channel. *Neuroreport* 3:1001-1004.
- Dineley KT, Bell KA, Bui D, Sweatt JD. 2002. beta -Amyloid peptide activates alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors expressed in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* 277:25056-25061.

- DiPaola M, Czajkowski C, Karlin A. 1989. The sidedness of the COOH terminus of the acetylcholine receptor delta subunit. *J Biol Chem* 264:15457-15463.
- Dougherty DA, Stauffer DA. 1990. Acetylcholine binding by a synthetic receptor: implications for biological recognition. *Science* 250:1558-1560.
- Dougherty DA. 1996. Cation-pi interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* 271:163-168.
- Dougherty DA, Lester HA. 2001. Neurobiology. Snails, synapses and smokers. *Nature* 411:252-253, 255.
- Dougherty JJ, Wu J, Nichols RA. 2003. Beta-amyloid regulation of presynaptic nicotinic receptors in rat hippocampus and neocortex. *J Neurosci* 23:6740-6747.
- 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.
- Doyle DA. 2004. Structural changes during ion channel gating. *Trends Neurosci* 27:298-302.
- Dreyer EB, Hasan F, Cohen SG, Cohen JB. 1986. Reaction of [3H]meproadifen mustard with membrane-bound Torpedo acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 261:13727-13734.
- Drisdel RC, Green WN. 2000. Neuronal alpha-bungarotoxin receptors are alpha7 subunit homomers. *J Neurosci* 20:133-139.
- Du C, Role LW. 2001. Differential modulation of nicotinic acetylcholine receptor subtypes and synaptic transmission in chick sympathetic ganglia by PGE(2). *J Neurophysiol* 85:2498-2508.
- Dudel J, Franke C. 1995. Evolution and desensitization of LGIC receptors. *Trends Neurosci* 18:297-298; author reply 298-299.
- Dutertre S, Nicke A, Tyndall JD, Lewis RJ. 2004. Determination of alpha-conotoxin binding modes on neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Mol Recognit* 17:339-347.
- 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.
- Dutzler R. 2004. The structural basis of ClC chloride channel function. *Trends Neurosci* 27:315-320.
- Duvoisin RM, Deneris ES, Patrick J, Heinemann S. 1989. The functional diversity of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors is increased by a novel subunit: beta 4. *Neuron* 3:487-496.

E

- Edelstein SJ, Schaad O, Henry E, Bertrand D, Changeux JP. 1996. A kinetic mechanism for nicotinic acetylcholine receptors based on multiple allosteric transitions. *Biol Cybern* 75:361-379.
- Edelstein SJ, Schaad O, Changeux JP. 1997. Single binding versus single channel recordings: a new approach to study ionotropic receptors. *Biochemistry* 36:13755-13760.
- Eigen M. 1968. New looks and outlooks on physical enzymology. *Q Rev Biophys* 1:3-33.
- Eisele JL, Bertrand S, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Changeux JP, Bertrand D. 1993. Chimaeric nicotinic-serotonergic receptor combines distinct ligand binding and channel specificities. *Nature* 366:479-483.
- Eldefrawi AT, Miller ER, Murphy DL, Eldefrawi ME. 1982. [3H]Phencyclidine interactions with the nicotinic acetylcholine receptor channel and its inhibition by psychotropic,

- antipsychotic, opiate, antidepressant, antibiotic, antiviral, and antiarrhythmic drugs. *Mol Pharmacol* 22:72-81.
- Elgoyhen AB, Johnson DS, Boulter J, Vetter DE, Heinemann S. 1994. Alpha 9: an acetylcholine receptor with novel pharmacological properties expressed in rat cochlear hair cells. *Cell* 79:705-715.
- Elgoyhen AB, Vetter DE, Katz E, Rothlin CV, Heinemann SF, Boulter J. 2001. alpha10: a determinant of nicotinic cholinergic receptor function in mammalian vestibular and cochlear mechanosensory hair cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3501-3506.
- Engel AG, Ohno K, Bouzat C, Sine SM, Griggs RC. 1996. End-plate acetylcholine receptor deficiency due to nonsense mutations in the epsilon subunit. *Ann Neurol* 40:810-817.
- Engel AG, Ohno K, Sine SM. 1998. Congenital myasthenic syndromes: experiments of nature. *J Physiol Paris* 92:113-117.
- Engel AG, Ohno K, Sine SM. 2003. Congenital myasthenic syndromes: progress over the past decade. *Muscle Nerve* 27:4-25.
- England PM, Zhang Y, Dougherty DA, Lester HA. 1999. Backbone mutations in transmembrane domains of a ligand-gated ion channel: implications for the mechanism of gating. *Cell* 96:89-98.
- Espinoza-Fonseca LM. 2004. Base docking model of the homomeric alpha7 nicotinic receptor-beta-amyloid [Formula: see text] complex. *Biochem Biophys Res Commun* 320:587-591.

F

- Faller M, Niederweis M, Schulz GE. 2004. The structure of a mycobacterial outer-membrane channel. *Science* 303:1189-1192.
- Feldberg W, Fessard, A., Nachmansohn, D. 1940. The cholinergic nature of the nervous supply to electric organ of the Torpedo (*Torpedo marmorata*). *J. Physiol.* 97:3-4.
- Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W. 1998. Siderophore-mediated iron transport: crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282:2215-2220.
- Ferreira KN, Iverson TM, Maghlaoui K, Barber J, Iwata S. 2004. Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303:1831-1838.
- Fischer M, Corringer PJ, Schott K, Bacher A, Changeux JP. 2001. A method for soluble overexpression of the alpha7 nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3567-3570.
- Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. 1992. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 41:31-37.
- Forsayeth JR, Kobrin E. 1997. Formation of oligomers containing the beta3 and beta4 subunits of the rat nicotinic receptor. *J Neurosci* 17:1531-1538.
- Forst D, Welte W, Wacker T, Diederichs K. 1998. Structure of the sucrose-specific porin ScrY from *Salmonella typhimurium* and its complex with sucrose. *Nat Struct Biol* 5:37-46.
- Foucaud B, Perret P, Grutter T, Goeldner M. 2001. Cysteine mutants as chemical sensors for ligand-receptor interactions. *Trends Pharmacol Sci* 22:170-173.
- Fruchart-Gaillard C, Gilquin B, Antil-Delbeke S, Le Novère N, Tamiya T, Corringer PJ, Changeux JP, Menez A, Servent D. 2002. Experimentally based model of a complex between a snake toxin and the alpha 7 nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3216-3221.

- Fu D, Libson A, Stroud R. 2002. The structure of GlpF, a glycerol conducting channel. *Novartis Found Symp* 245:51-61; discussion 61-55, 165-168.
- Fu W, Jhamandas JH. 2003. Beta-amyloid peptide activates non- $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in rat basal forebrain neurons. *J Neurophysiol* 90:3130-3136.
- Fucile S, Barabino B, Palma E, Grassi F, Limatola C, Mileo AM, Alema S, Ballivet M, Eusebi F. 1997. Alpha 5 subunit forms functional alpha 3 beta 4 alpha 5 nAChRs in transfected human cells. *Neuroreport* 8:2433-2436.
- Fucile S, Matter JM, Erkman L, Ragozzino D, Barabino B, Grassi F, Alema S, Ballivet M, Eusebi F. 1998. The neuronal alpha6 subunit forms functional heteromeric acetylcholine receptors in human transfected cells. *Eur J Neurosci* 10:172-178.

G

- Gallagher MJ, Cohen JB. 1999. Identification of amino acids of the torpedo nicotinic acetylcholine receptor contributing to the binding site for the noncompetitive antagonist [(3)H]tetracaine. *Mol Pharmacol* 56:300-307.
- Gallagher MJ, Chiara DC, Cohen JB. 2001. Interactions between 3-(Trifluoromethyl)-3-(m-[(125)I]iodophenyl)diazirine and tetracaine, phencyclidine, or histrionicotoxin in the Torpedo series nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *Mol Pharmacol* 59:1514-1522.
- Galzi JL, Revah F, Black D, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. 1990. Identification of a novel amino acid alpha-tyrosine 93 within the cholinergic ligands-binding sites of the acetylcholine receptor by photoaffinity labeling. Additional evidence for a three-loop model of the cholinergic ligands-binding sites. *J Biol Chem* 265:10430-10437.
- Galzi JL, Bertrand D, Devillers-Thiery A, Revah F, Bertrand S, Changeux JP. 1991. Functional significance of aromatic amino acids from three peptide loops of the alpha 7 neuronal nicotinic receptor site investigated by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 294:198-202.
- Galzi JL, Revah F, Bouet F, Menez A, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. 1991. Allosteric transitions of the acetylcholine receptor probed at the amino acid level with a photolabile cholinergic ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:5051-5055.
- Galzi JL, Devillers-Thiery A, Hussy N, Bertrand S, Changeux JP, Bertrand D. 1992. Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic. *Nature* 359:500-505.
- Galzi JL, Changeux JP. 1995. Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacology* 34:563-582.
- Galzi JL, Bertrand S, Corringer PJ, Changeux JP, Bertrand D. 1996. Identification of calcium binding sites that regulate potentiation of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* 15:5824-5832.
- Garbus I, Roccamo AM, Barrantes FJ. 2002. Identification of threonine 422 in transmembrane domain alpha M4 of the nicotinic acetylcholine receptor as a possible site of interaction with hydrocortisone. *Neuropharmacology* 43:65-73.
- Gerzanich V, Kuryatov A, Anand R, Lindstrom J. 1997. "Orphan" alpha6 nicotinic AChR subunit can form a functional heteromeric acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* 51:320-327.
- Gill CH, Peters JA, Lambert JJ. 1995. An electrophysiological investigation of the properties of a murine recombinant 5-HT3 receptor stably expressed in HEK 293 cells. *Br J Pharmacol* 114:1211-1221.

- Giraudat J, Devillers-Thiery A, Auffray C, Rougeon F, Changeux JP. 1982. Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. *Embo J* 1:713-717.
- Giraudat J, Montecucco C, Bisson R, Changeux JP. 1985. Transmembrane topology of acetylcholine receptor subunits probed with photoreactive phospholipids. *Biochemistry* 24:3121-3127.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Chang JY, Changeux JP. 1986. Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: serine-262 of the delta subunit is labeled by [3H]chlorpromazine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:2719-2723.
- Giraudat J, Dennis M, Heidmann T, Haumont PY, Lederer F, Changeux JP. 1987. Structure of the high-affinity binding site for noncompetitive blockers of the acetylcholine receptor: [3H]chlorpromazine labels homologous residues in the beta and delta chains. *Biochemistry* 26:2410-2418.
- Giraudat J, Gali J, Revah F, Changeux J, Haumont P, Lederer F. 1989. The noncompetitive blocker [(3)H]chlorpromazine labels segment M2 but not segment M1 of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *FEBS Lett* 253:190-198.
- Girod R, Crabtree G, Ernstrom G, Ramirez-Latorre J, McGehee D, Turner J, Role L. 1999. Heteromeric complexes of alpha 5 and/or alpha 7 subunits. Effects of calcium and potential role in nicotine-induced presynaptic facilitation. *Ann N Y Acad Sci* 868:578-590.
- Gisselmann G, Pusch H, Hovemann BT, Hatt H. 2002. Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nat Neurosci* 5:11-12.
- Goeldner MP, Hirth CG. 1980. Specific photoaffinity labeling induced by energy transfer: application to irreversible inhibition of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:6439-6442.
- Goeldner MP, Hirth CG, Rossi B, Ponzio G, Lazdunski M. 1983. Specific photoaffinity labeling of the digitalis binding site of the sodium and potassium ion activated adenosinetriphosphatase induced by energy transfer. *Biochemistry* 22:4685-4690.
- Gomez CM, Maselli R, Gammack J, Lasalde J, Tamamizu S, Cornblath DR, Lehar M, McNamee M, Kunkel RW. 1996. A beta-subunit mutation in the acetylcholine receptor channel gate causes severe slow-channel syndrome. *Ann Neurol* 39:712-723.
- Gotti C, Hanke W, Maury K, Moretti M, Ballivet M, Clementi F, Bertrand D. 1994. Pharmacology and biophysical properties of alpha 7 and alpha 7-alpha 8 alpha-bungarotoxin receptor subtypes immunopurified from the chick optic lobe. *Eur J Neurosci* 6:1281-1291.
- Grant MA, Gentile LN, Shi QL, Pellegrini M, Hawrot E. 1999. Expression and spectroscopic analysis of soluble nicotinic acetylcholine receptor fragments derived from the extracellular domain of the alpha-subunit. *Biochemistry* 38:10730-10742.
- Grassi F, Palma E, Tonini R, Amici M, Ballivet M, Eusebi F. 2003. Amyloid beta(1-42) peptide alters the gating of human and mouse alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors. *J Physiol* 547:147-157.
- Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, Gundelfinger ED, Betz H. 1987. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature* 328:215-220.
- Groot-Kormelink PJ, Luyten WH, Colquhoun D, Sivilotti LG. 1998. A reporter mutation approach shows incorporation of the "orphan" subunit beta3 into a functional nicotinic receptor. *J Biol Chem* 273:15317-15320.

- Grosman C, Auerbach A. 2000. Kinetic, mechanistic, and structural aspects of unliganded gating of acetylcholine receptor channels: a single-channel study of second transmembrane segment 12' mutants. *J Gen Physiol* 115:621-635.
- Grosman C, Salamone FN, Sine SM, Auerbach A. 2000. The extracellular linker of muscle acetylcholine receptor channels is a gating control element. *J Gen Physiol* 116:327-340.
- Grosman C, Zhou M, Auerbach A. 2000. Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 403:773-776.
- Grosman C, Auerbach A. 2001. The dissociation of acetylcholine from open nicotinic receptor channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:14102-14107.
- Grueter T, Ehret-Sabatier L, Kotzyba-Hibert F, Goeldner M. 2000. Photoaffinity labeling of Torpedo nicotinic receptor with the agonist [3H]DCTA: identification of amino acid residues which contribute to the binding of the ester moiety of acetylcholine. *Biochemistry* 39:3034-3043.
- Grueter T, Changeux JP. 2001. Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem Sci* 26:459-463.
- Grueter T, Bertrand S, Kotzyba-Hibert F, Bertrand D, Goeldner M. 2002. Structural reorganization of the acetylcholine binding site of the torpedo nicotinic receptor as revealed by dynamic photoaffinity labeling. *Chembiochem* 3:652-658.
- Grueter T, Prado de Carvalho L, Le Novere N, Corringer PJ, Edelstein S, Changeux JP. 2003. An H-bond between two residues from different loops of the acetylcholine binding site contributes to the activation mechanism of nicotinic receptors. *Embo J* 22:1990-2003.
- Gu Y, Hall ZW. 1988. Immunological evidence for a change in subunits of the acetylcholine receptor in developing and denervated rat muscle. *Neuron* 1:117-125.
- Gundelfinger ED. 1995. Evolution and desensitization of LGIC receptors. *Trends Neurosci* 18:297; author reply 298-299.
- Gunthorpe MJ, Lummis SC. 2001. Conversion of the ion selectivity of the 5-HT(3a) receptor from cationic to anionic reveals a conserved feature of the ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 276:10977-10983.

H

- Hansen SB, Radic Z, Talley TT, Molles BE, Deerinck T, Tsigelny I, Taylor P. 2002. Tryptophan fluorescence reveals conformational changes in the acetylcholine binding protein. *J Biol Chem* 277:41299-41302.
- Hansen SB, Talley TT, Radic Z, Taylor P. 2004. Structural and ligand recognition characteristics of an acetylcholine-binding protein from *Aplysia californica*. *J Biol Chem* 279:24197-24202.
- Harel M, Kashner R, Nicolas A, Guss JM, Balass M, Fridkin M, Smit AB, Brejc K, Sixma TK, Katchalski-Katzir E, Sussman JL, Fuchs S. 2001. The binding site of acetylcholine receptor as visualized in the X-Ray structure of a complex between alpha-bungarotoxin and a mimotope peptide. *Neuron* 32:265-275.
- Hatanaka Y, Sadakane Y. 2002. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Curr Top Med Chem* 2:271-288.
- Heidmann T, Changeux JP. 1979. Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem* 94:281-296.
- Heidmann T, Changeux JP. 1980. Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* in the millisecond time range: resolution

- of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects. *Biochem Biophys Res Commun* 97:889-896.
- Heidmann T, Bernhardt J, Neumann E, Changeux JP. 1983. Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from *Torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22:5452-5459.
- Heidmann T, Oswald RE, Changeux JP. 1983. Multiple sites of action for noncompetitive blockers on acetylcholine receptor rich membrane fragments from *torpedo marmorata*. *Biochemistry* 22:3112-3127.
- Heidmann T, Changeux JP. 1984. Time-resolved photolabeling by the noncompetitive blocker chlorpromazine of the acetylcholine receptor in its transiently open and closed ion channel conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:1897-1901.
- Heidmann T, Changeux JP. 1986. Characterization of the transient agonist-triggered state of the acetylcholine receptor rapidly labeled by the noncompetitive blocker [3H]chlorpromazine: additional evidence for the open channel conformation. *Biochemistry* 25:6109-6113.
- Horenstein J, Wagner DA, Czajkowski C, Akabas MH. 2001. Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment. *Nat Neurosci* 4:477-485.
- Horton RM, Manfredi AA, Conti-Tronconi BM. 1993. The 'embryonic' gamma subunit of the nicotinic acetylcholine receptor is expressed in adult extraocular muscle. *Neurology* 43:983-986.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG. 2003. Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* 6:362-369.
- Hsiao B, Dweck D, Luetje CW. 2001. Subunit-dependent modulation of neuronal nicotinic receptors by zinc. *J Neurosci* 21:1848-1856.
- Hsu KS. 1994. Modulation of the nicotinic acetylcholine receptor channels by spermine in *Xenopus* muscle cell culture. *Neurosci Lett* 182:99-103.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M, Wang DN. 2003. Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301:616-620.
- Hucho F, Oberthür W, Lottspeich F. 1986. The ion channel of the nicotinic acetylcholine receptor is formed by the homologous helices M II of the receptor subunits. *FEBS Lett* 205:137-142.
- Huebsch KA, Maimone MM. 2003. Rapsyn-mediated clustering of acetylcholine receptor subunits requires the major cytoplasmic loop of the receptor subunits. *J Neurobiol* 54:486-501.

I

- Ibanez-Tallon I, Miwa JM, Wang HL, Adams NC, Crabtree GW, Sine SM, Heintz N. 2002. Novel modulation of neuronal nicotinic acetylcholine receptors by association with the endogenous prototoxin *lynx1*. *Neuron* 33:893-903.
- Igusa Y. 1988. Adenosine 5'-triphosphate activates acetylcholine receptor channels in cultured *Xenopus* myotomal muscle cells. *J Physiol* 405:169-185.
- Imoto K, Methfessel C, Sakmann B, Mishina M, Mori Y, Konno T, Fukuda K, Kurasaki M, Bujo H, Fujita Y, et al. 1986. Location of a delta-subunit region determining ion transport through the acetylcholine receptor channel. *Nature* 324:670-674.

- Imoto K, Busch C, Sakmann B, Mishina M, Konno T, Nakai J, Bujo H, Mori Y, Fukuda K, Numa S. 1988. Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature* 335:645-648.
- Imoto K, Konno T, Nakai J, Wang F, Mishina M, Numa S. 1991. A ring of uncharged polar amino acids as a component of channel constriction in the nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Lett* 289:193-200.
- Iverson TM, Luna-Chavez C, Cecchini G, Rees DC. 1999. Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science* 284:1961-1966.
- Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. 1995. Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* 376:660-669.
- Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S, Jap BK. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Science* 281:64-71.

J

- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* 417:515-522.
- Jiang Y, Lee A, Chen J, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. 2002. The open pore conformation of potassium channels. *Nature* 417:523-526.
- 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.
- Johnson DA, Voet JG, Taylor P. 1984. Fluorescence energy transfer between cobra alpha-toxin molecules bound to the acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 259:5717-5725.
- Jones AK, Elgar G, Sattelle DB. 2003. The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the pufferfish, *Fugu rubripes*. *Genomics* 82:441-451.
- Jones AK, Sattelle DB. 2004. Functional genomics of the nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Bioessays* 26:39-49.
- Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. 1997. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267:727-748.
- Jones MV, Westbrook GL. 1996. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 19:96-101.
- Jordan P, Fromme P, Witt HT, Klukas O, Saenger W, Krauss N. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* 411:909-917.
- Jormakka M, Tornroth S, Byrne B, Iwata S. 2002. Molecular basis of proton motive force generation: structure of formate dehydrogenase-N. *Science* 295:1863-1868.

K

- Kao PN, Dwork AJ, Kaldany RR, Silver ML, Wideman J, Stein S, Karlin A. 1984. Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. *J Biol Chem* 259:11662-11665.
- Karlin A, Akabas MH. 1998. Substituted-cysteine accessibility method. *Methods Enzymol* 293:123-145.
- Karlin A. 2002. Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3:102-114.

- Karnovsky AM, Gotow LF, McKinley DD, Piechan JL, Ruble CL, Mills CJ, Schellin KA, Slightom JL, Fitzgerald LR, Benjamin CW, Roberds SL. 2003. A cluster of novel serotonin receptor 3-like genes on human chromosome 3. *Gene* 319:137-148.
- Karpen JW, Ruiz M. 2002. Ion channels: does each subunit do something on its own? *Trends Biochem Sci* 27:402-409.
- Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL. 2003. Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* 421:272-275.
- Katz B, Thesleff S. 1957. A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J Physiol* 138:63-80.
- Kelley SP, Dunlop JJ, Kirkness EF, Lambert JJ, Peters JA. 2003. A cytoplasmic region determines single-channel conductance in 5-HT₃ receptors. *Nature* 424:321-324.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, French CR, Schofield PR, Barry PH. 2000. M2 pore mutations convert the glycine receptor channel from being anion- to cation-selective. *Biophys J* 79:247-259.
- Keramidas A, Moorhouse AJ, Pierce KD, Schofield PR, Barry PH. 2002. Cation-selective mutations in the M2 domain of the inhibitory glycine receptor channel reveal determinants of ion-charge selectivity. *J Gen Physiol* 119:393-410.
- Kessler P, Chatrenet B, Goeldner M, Hirth C. 1990. 1-[4-(N-Chlorocarbonyl)-N-methylamino]phenyl]-2-(phenylsulfonyl)diazene, a bifunctional reagent with a protected diazonium function. *Synthesis* 11:1065-1068.
- Keyser KT, Britto LR, Schoepfer R, Whiting P, Cooper J, Conroy W, Brozowska-Precht A, Karten HJ, Lindstrom J. 1993. Three subtypes of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic acetylcholine receptors are expressed in chick retina. *J Neurosci* 13:442-454.
- Khakh BS, Zhou X, Sydes J, Galligan JJ, Lester HA. 2000. State-dependent cross-inhibition between transmitter-gated cation channels. *Nature* 406:405-410.
- Khiroug SS, Harkness PC, Lamb PW, Sudweeks SN, Khiroug L, Millar NS, Yakel JL. 2002. Rat nicotinic ACh receptor alpha7 and beta2 subunits co-assemble to form functional heteromeric nicotinic receptor channels. *J Physiol* 540:425-434.
- Kieffer B, Goeldner M, Hirth C, Aebersold R, Chang JY. 1986. Sequence determination of a peptide fragment from electric eel acetylcholinesterase, involved in the binding of quaternary ammonium. *FEBS Lett* 202:91-96.
- Kienker P, Tomaselli G, Jurman M, Yellen G. 1994. Conductance mutations of the nicotinic acetylcholine receptor do not act by a simple electrostatic mechanism. *Biophys J* 66:325-334.
- Kim J, McNamee MG. 1998. Topological disposition of Cys 222 in the alpha-subunit of nicotinic acetylcholine receptor analyzed by fluorescence-quenching and electron paramagnetic resonance measurements. *Biochemistry* 37:4680-4686.
- Kleijnung J, Petit MC, Orlewski P, Mamalaki A, Tzartos SJ, Tsikaris V, Sakarellos-Daitsiotis M, Sakarellos C, Marraud M, Cung MT. 2000. The third-dimensional structure of the complex between an Fv antibody fragment and an analogue of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor: a combined two-dimensional NMR, homology, and molecular modeling approach. *Biopolymers* 53:113-128.
- Klink R, de Kerchove d'Exaerde A, Zoli M, Changeux JP. 2001. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei. *J Neurosci* 21:1452-1463.

- Klotz P, Chatrenet B, Coppo M, Rousseau B, Goeldner M, Hirth C. 1991. Synthesis of a tri-
tritiated heterobifunctional reagent, a potential tool in photoaffinity labeling technology.
J Label Compd Radiopharm 29:149-155.
- Kolbe M, Besir H, Essen LO, Oesterhelt D. 2000. Structure of the light-driven chloride pump
halorhodopsin at 1.8 Å resolution. *Science* 288:1390-1396.
- Konno T, Busch C, Von Kitzing E, Imoto K, Wang F, Nakai J, Mishina M, Numa S, Sakmann B.
1991. Rings of anionic amino acids as structural determinants of ion selectivity in the
acetylcholine receptor channel. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 244:69-79.
- Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B, Hughes C. 2000. Crystal structure of the bacterial
membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405:914-
919.
- Koshland DE, Jr., Nemethy G, Filmer D. 1966. Comparison of experimental binding data and
theoretical models in proteins containing subunits. *Biochemistry* 5:365-385.
- Kotzyba-Hibert F, Kapfer I, Goeldner M. 1995. Recent Trends In Photoaffinity Labeling.
Angewandte Chemie-International Edition 34:1296-1312.
- Kotzyba-Hibert F, Kessler P, Zerbib V, Grutter T, Bogen C, Takeda K, Hammadi A, Knerr L,
Goeldner M. 1997. Nicotinic acetylcholine receptor labeled with a tritiated,
photoactivatable agonist: a new tool for investigating the functional, activated state.
Bioconj Chem 8:472-480.
- Kotzyba-Hibert F, Mourot A, Grutter T, Goeldner M. 2004. Mapping the Acetylcholine Binding
Sites of Torpedo Nicotinic Receptor using Photoaffinity Labeling : past, present and
future. In: A. Fisher and H. Soreq Eds. MDL, editor. A. Fisher and H. Soreq Eds. MDLs.
XIth Cholinergic Mechanisms Symposium. London.
- Kramer W, Sauber K, Baringhaus KH, Kurz M, Stengelin S, Lange G, Corsiero D, Girbig F,
Konig W, Weyland C. 2001. Identification of the bile acid-binding site of the ileal lipid-
binding protein by photoaffinity labeling, matrix-assisted laser desorption ionization-mass
spectrometry, and NMR structure. *J Biol Chem* 276:7291-7301.
- Krause RM, Buisson B, Bertrand S, Corringer PJ, Galzi JL, Changeux JP, Bertrand D. 1998.
Ivermectin: a positive allosteric effector of the $\alpha 7$ neuronal nicotinic acetylcholine
receptor. *Mol Pharmacol* 53:283-294.
- Kubalek E, Ralston S, Lindstrom J, Unwin N. 1987. Location of subunits within the acetylcholine
receptor by electron image analysis of tubular crystals from *Torpedo marmorata*. *J Cell
Biol* 105:9-18.
- Kuhlmann J, Okonjo KO, Maelicke A. 1991. Desensitization is a property of the cholinergic
binding region of the nicotinic acetylcholine receptor, not of the receptor-integral ion
channel. *FEBS Lett* 279:216-218.
- 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.
- Kuo A, Gulbis JM, Antcliff JF, Rahman T, Lowe ED, Zimmer J, Cuthbertson J, Ashcroft FM,
Ezaki T, Doyle DA. 2003. Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the
closed state. *Science* 300:1922-1926.
- Kurisu G, Zhang H, Smith JL, Cramer WA. 2003. Structure of the cytochrome b6f complex of
oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* 302:1009-1014.
- Kuryatov A, Olale F, Cooper J, Choi C, Lindstrom J. 2000. Human $\alpha 6$ AChR subtypes:
subunit composition, assembly, and pharmacological responses. *Neuropharmacology*
39:2570-2590.

Kusmann M, Nordhoff E, Rahbek-Nielsen H, Heaebel S, Rossel-Larsen M, Jakobsen L, Gobom J, Mirgorodskaya E, Kroll-Kristensen A, Palm L, Roepstorff P. 1997. Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry Sample Preparation Techniques Designed for Various Peptide and Protein Analytes. *Journal of Mass Spectrometry* 32:593-601.

L

- Lancaster CR, Kroger A, Auer M, Michel H. 1999. Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature* 402:377-385.
- Langenbuch-Cachat J, Bon C, Mulle C, Goeldner M, Hirth C, Changeux JP. 1988. Photoaffinity labeling of the acetylcholine binding sites on the nicotinic receptor by an aryl diazonium derivative. *Biochemistry* 27:2337-2345.
- Langley JN. 1906. On nerve endings and special excitable substances in cell. *Proc.R.Soc. (London)* 78:170-194.
- Langley JN. 1907. On the contraction of muscle, chiefly in relation to the presence of 'receptive' substances. *J. Physiol.* 36:347-384.
- Le Novere N, Changeux JP. 1995. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 40:155-172.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP. 1999. Improved secondary structure predictions for a nicotinic receptor subunit: incorporation of solvent accessibility and experimental data into a two-dimensional representation. *Biophys J* 76:2329-2345.
- Le Novere N, Corringer PJ, Changeux JP. 2002. The diversity of subunit composition in nAChRs: evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. *J Neurobiol* 53:447-456.
- Le Novere N, Grutter T, Changeux JP. 2002. Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3210-3215.
- Lee FJ, Xue S, Pei L, Vukusic B, Chery N, Wang Y, Wang YT, Niznik HB, Yu XM, Liu F. 2002. Dual regulation of NMDA receptor functions by direct protein-protein interactions with the dopamine D1 receptor. *Cell* 111:219-230.
- Leite JF, Blanton MP, Shahgholi M, Dougherty DA, Lester HA. 2003. Conformation-dependent hydrophobic photolabeling of the nicotinic receptor: electrophysiology-coordinated photochemistry and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13054-13059.
- Lena C, de Kerchove D'Exaerde A, Cordero-Erausquin M, Le Novere N, del Mar Arroyo-Jimenez M, Changeux JP. 1999. Diversity and distribution of nicotinic acetylcholine receptors in the locus ceruleus neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:12126-12131.
- Leonard RJ, Labarca CG, Charnet P, Davidson N, Lester HA. 1988. Evidence that the M2 membrane-spanning region lines the ion channel pore of the nicotinic receptor. *Science* 242:1578-1581.
- Leonard RJ, Charnet P, Labarca C, Vogelaar NJ, Czyzyk L, Gouin A, Davidson N, Lester HA. 1991. Reverse pharmacology of the nicotinic acetylcholine receptor. Mapping the local anesthetic binding site. *Ann N Y Acad Sci* 625:588-599.
- Lester HA, Dibas MI, Dahan DS, Leite JF, Dougherty DA. 2004. Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27:329-336.

- Li L, Schuchard M, Palma A, Pradier L, McNamee MG. 1990. Functional role of the cysteine 451 thiol group in the M4 helix of the gamma subunit of *Torpedo californica* acetylcholine receptor. *Biochemistry* 29:5428-5436.
- Lindstrom J. 2002. Autoimmune diseases involving nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:656-665.
- Lippiello PM, Sears SB, Fernandes KG. 1987. Kinetics and mechanism of L-[3H]nicotine binding to putative high affinity receptor sites in rat brain. *Mol Pharmacol* 31:392-400.
- Liu DM, Cuevas J, Adams DJ. 2000. VIP and PACAP potentiation of nicotinic ACh-evoked currents in rat parasympathetic neurons is mediated by G-protein activation. *Eur J Neurosci* 12:2243-2251.
- Liu F, Wan Q, Pristupa ZB, Yu XM, Wang YT, Niznik HB. 2000. Direct protein-protein coupling enables cross-talk between dopamine D5 and gamma-aminobutyric acid A receptors. *Nature* 403:274-280.
- Liu Q, Kawai H, Berg DK. 2001. beta -Amyloid peptide blocks the response of alpha 7-containing nicotinic receptors on hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4734-4739.
- Liu Z, Yan H, Wang K, Kuang T, Zhang J, Gui L, An X, Chang W. 2004. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature* 428:287-292.
- Locher KP, Lee AT, Rees DC. 2002. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091-1098.
- Loudwig S, Specht A, Goeldner M. 2002. Les composés ""cagés"" ou les précurseurs photochimiques de molécules biologiquement actives. *Mise au point et perspectives. L'Actualité Chimique*:7-12.
- Luecke H, Schobert B, Lanyi JK, Spudich EN, Spudich JL. 2001. Crystal structure of sensory rhodopsin II at 2.4 angstroms: insights into color tuning and transducer interaction. *Science* 293:1499-1503.
- Lugovskoy AA, Maslennikov IV, Utkin YN, Tsetlin VI, Cohen JB, Arseniev AS. 1998. Spatial structure of the M3 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *Eur J Biochem* 255:455-461.

M

- Machold J, Utkin Y, Kirsch D, Kaufmann R, Tsetlin V, Hucho F. 1995. Photolabeling reveals the proximity of the alpha-neurotoxin binding site to the M2 helix of the ion channel in the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7282-7286.
- Maelicke A, Schrattenholz A, Samochocki M, Radina M, Albuquerque EX. 2000. Allosterically potentiating ligands of nicotinic receptors as a treatment strategy for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 113:199-206.
- Maimone MM, Merlie JP. 1993. Interaction of the 43 kd postsynaptic protein with all subunits of the muscle nicotinic acetylcholine receptor. *Neuron* 11:53-66.
- Maksay G, Bikadi Z, Simonyi M. 2003. Binding interactions of antagonists with 5-hydroxytryptamine_{3A} receptor models. *J Recept Signal Transduct Res* 23:255-270.
- Margiotta JF, Pardi D. 1995. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptors mediate cyclic AMP-dependent enhancement of neuronal acetylcholine sensitivity. *Mol Pharmacol* 48:63-71.
- Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. 1991. Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 254:432-437.

- Marquez J, Iriarte A, Martinez-Carrion M. 1989. Covalent modification of a critical sulfhydryl group in the acetylcholine receptor: cysteine-222 of the alpha-subunit. *Biochemistry* 28:7433-7439.
- Marti-Renom MA, Stuart AC, Fiser A, Sanchez R, Melo F, Sali A. 2000. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29:291-325.
- Martin M, Czajkowski C, Karlin A. 1996. The contributions of aspartyl residues in the acetylcholine receptor gamma and delta subunits to the binding of agonists and competitive antagonists. *J Biol Chem* 271:13497-13503.
- Martinez KL, Corringer PJ, Edelstein SJ, Changeux JP, F Miqm. 2000. Structural differences in the two agonist binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 39:6979-6990.
- Matsubara N, Billington AP, Hess GP. 1992. How fast does an acetylcholine receptor channel open? Laser-pulse photolysis of an inactive precursor of carbamoylcholine in the microsecond time region with BC3H1 cells. *Biochemistry* 31:5507-5514.
- Mayer ML, Olson R, Gouaux E. 2001. Mechanisms for ligand binding to GluR0 ion channels: crystal structures of the glutamate and serine complexes and a closed apo state. *J Mol Biol* 311:815-836.
- McCrea PD, Popot JL, Engelman DM. 1987. Transmembrane topography of the nicotinic acetylcholine receptor delta subunit. *Embo J* 6:3619-3626.
- McLaughlin JT, Hawrot E, Yellen G. 1995. Covalent modification of engineered cysteines in the nicotinic acetylcholine receptor agonist-binding domain inhibits receptor activation. *Biochem J* 310 (Pt 3):765-769.
- Methot N, Ritchie BD, Blanton MP, Baenziger JE. 2001. Structure of the pore-forming transmembrane domain of a ligand-gated ion channel. *J Biol Chem* 276:23726-23732.
- Michalski WP, Shiell BJ. 1999. Strategies for analysis of electrophoretically separated proteins and peptides. *Analytica Chimica Acta* 383:27-46.
- Middleton RE, Cohen JB. 1991. Mapping of the acetylcholine binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: [3H]nicotine as an agonist photoaffinity label. *Biochemistry* 30:6987-6997.
- Middleton RE, Strnad NP, Cohen JB. 1999. Photoaffinity labeling the torpedo nicotinic acetylcholine receptor with [(3)H]tetracaine, a nondesensitizing noncompetitive antagonist. *Mol Pharmacol* 56:290-299.
- Mileo AM, Monaco L, Palma E, Grassi F, Miledi R, Eusebi F. 1995. Two forms of acetylcholine receptor gamma subunit in mouse muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2686-2690.
- Millar NS. 2003. Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31:869-874.
- Milone M, Wang HL, Ohno K, Fukudome T, Pruitt JN, Bren N, Sine SM, Engel AG. 1997. Slow-channel myasthenic syndrome caused by enhanced activation, desensitization, and agonist binding affinity attributable to mutation in the M2 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit. *J Neurosci* 17:5651-5665.
- Min CK, Weiland GA. 1993. Effects of substance P on the binding of agonists to the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electroplaque. *J Neurochem* 60:2238-2246.
- Min CK, Owens J, Weiland GA. 1994. Characterization of the binding of [3H]substance P to the nicotinic acetylcholine receptor of Torpedo electroplaque. *Mol Pharmacol* 45:221-227.

- Mishina M, Takai T, Imoto K, Noda M, Takahashi T, Numa S, Methfessel C, Sakmann B. 1986. Molecular distinction between fetal and adult forms of muscle acetylcholine receptor. *Nature* 321:406-411.
- Mitra AK, McCarthy MP, Stroud RM. 1989. Three-dimensional structure of the nicotinic acetylcholine receptor and location of the major associated 43-kD cytoskeletal protein, determined at 22 Å by low dose electron microscopy and x-ray diffraction to 12.5 Å. *J Cell Biol* 109:755-774.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. 1999. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288:765-786.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. 2003. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423:949-955.
- Moise L, Piserchio A, Basus VJ, Hawrot E. 2002. NMR structural analysis of alpha-bungarotoxin and its complex with the principal alpha-neurotoxin-binding sequence on the alpha 7 subunit of a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 277:12406-12417.
- Molles BE, Tsigelny I, Nguyen PD, Gao SX, Sine SM, Taylor P. 2002. Residues in the epsilon subunit of the nicotinic acetylcholine receptor interact to confer selectivity of waglerin-1 for the alpha-epsilon subunit interface site. *Biochemistry* 41:7895-7906.
- Monod J, Wyman J, Changeux JP. 1965. On the Nature of Allosteric Transitions: A Plausible Model. *J Mol Biol* 12:88-118.
- Montal M, Opella SJ. 2002. The structure of the M2 channel-lining segment from the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1565:287-293.
- Moore MA, McCarthy MP. 1995. Snake venom toxins, unlike smaller antagonists, appear to stabilize a resting state conformation of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biochim Biophys Acta* 1235:336-342.
- Mouroit A, Kotzyba-Hibert F, Doris E, Goeldner M. 2002. New and convenient synthesis of a tritiated photo activatable nicotinic agonist: [H-3]-AC5. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 45:943-953.
- Mozrzymas JW, Ruzzier F. 1992. ATP activates junctional and extrajunctional acetylcholine receptor channels in isolated adult rat muscle fibres. *Neurosci Lett* 139:217-220.
- Mu TW, Lester HA, Dougherty DA. 2003. Different binding orientations for the same agonist at homologous receptors: a lock and key or a simple wedge? *J Am Chem Soc* 125:6850-6851.
- Mulle C, Lena C, Changeux JP. 1992. Potentiation of nicotinic receptor response by external calcium in rat central neurons. *Neuron* 8:937-945.
- Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419:587-593.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y. 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407:599-605.

N

- Nachon F, Ehret-Sabatier L, Loew D, Colas C, van Dorsselaer A, Goeldner M. 1998. Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. *Biochemistry* 37:10507-10513.
- Naranjo D, Brehm P. 1993. Modal shifts in acetylcholine receptor channel gating confer subunit-dependent desensitization. *Science* 260:1811-1814.

- Neher E, Sakmann B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 260:799-802.
- Neubig RR, Cohen JB. 1979. Equilibrium binding of [3H]tubocurarine and [3H]acetylcholine by Torpedo postsynaptic membranes: stoichiometry and ligand interactions. *Biochemistry* 18:5464-5475.
- Neubig RR, Krodel EK, Boyd ND, Cohen JB. 1979. Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:690-694.
- Nevin ST, Cromer BA, Haddrill JL, Morton CJ, Parker MW, Lynch JW. 2003. Insights into the structural basis for zinc inhibition of the glycine receptor. *J Biol Chem* 278:28985-28992.
- Nirthanan S, Gwee MC. 2004. Three-finger alpha-neurotoxins and the nicotinic acetylcholine receptor, forty years on. *J Pharmacol Sci* 94:1-17.
- Nishida M, MacKinnon R. 2002. Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* 111:957-965.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Hirose T, Asai M, Inayama S, Miyata T, Numa S. 1982. Primary structure of alpha-subunit precursor of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequence. *Nature* 299:793-797.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, Hirose T, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. 1983. Structural homology of Torpedo californica acetylcholine receptor subunits. *Nature* 302:528-532.
- Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Hirose T, Asai M, Takashima H, Inayama S, Miyata T, Numa S. 1983. Primary structures of beta- and delta-subunit precursors of Torpedo californica acetylcholine receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 301:251-255.
- 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.
- 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.

O

- O'Leary ME, Filatov GN, White MM. 1994. Characterization of d-tubocurarine binding site of Torpedo acetylcholine receptor. *Am J Physiol* 266:C648-653.
- Oberthur W, Muhn P, Baumann H, Lottspeich F, Wittmann-Liebold B, Hucho F. 1986. The reaction site of a non-competitive antagonist in the delta-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Embo J* 5:1815-1819.
- Oberthur W, Hucho F. 1988. Photoaffinity labeling of functional states of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Protein Chem* 7:141-150.
- Ochoa EL, Chattopadhyay A, McNamee MG. 1989. Desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor: molecular mechanisms and effect of modulators. *Cell Mol Neurobiol* 9:141-178.
- Ohno K, Hutchinson DO, Milone M, Brengman JM, Bouzat C, Sine SM, Engel AG. 1995. Congenital myasthenic syndrome caused by prolonged acetylcholine receptor channel openings due to a mutation in the M2 domain of the epsilon subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:758-762.
- Ohno K, Wang HL, Milone M, Bren N, Brengman JM, Nakano S, Quiram P, Pruitt JN, Sine SM, Engel AG. 1996. Congenital myasthenic syndrome caused by decreased agonist binding

- affinity due to a mutation in the acetylcholine receptor epsilon subunit. *Neuron* 17:157-170.
- Ohno K, Quiram PA, Milone M, Wang HL, Harper MC, Pruitt JN, 2nd, Brengman JM, Pao L, Fischbeck KH, Crawford TO, Sine SM, Engel AG. 1997. Congenital myasthenic syndromes due to heteroallelic nonsense/missense mutations in the acetylcholine receptor epsilon subunit gene: identification and functional characterization of six new mutations. *Hum Mol Genet* 6:753-766.
- Okonjo KO, Kuhlmann J, Maelicke A. 1991. A second pathway of activation of the Torpedo acetylcholine receptor channel. *Eur J Biochem* 200:671-677.
- Olale F, Gerzanich V, Kuryatov A, Wang F, Lindstrom J. 1997. Chronic nicotine exposure differentially affects the function of human alpha3, alpha4, and alpha7 neuronal nicotinic receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 283:675-683.
- Opella SJ, Marassi FM, Gesell JJ, Valente AP, Kim Y, Oblatt-Montal M, Montal M. 1999. Structures of the M2 channel-lining segments from nicotinic acetylcholine and NMDA receptors by NMR spectroscopy. *Nat Struct Biol* 6:374-379.
- Ortells MO, Lunt GG. 1995. Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-127.

P

- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M, Miyano M. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289:739-745.
- Palma E, Maggi L, Barabino B, Eusebi F, Ballivet M. 1999. Nicotinic acetylcholine receptors assembled from the alpha7 and beta3 subunits. *J Biol Chem* 274:18335-18340.
- Papineni RV, Sanchez JU, Baksi K, Willcockson IU, Pedersen SE. 2001. Site-specific charge interactions of alpha-conotoxin MI with the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 276:23589-23598.
- Papke RL, Boulter J, Patrick J, Heinemann S. 1989. Single-channel currents of rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 3:589-596.
- Pashkov VS, Maslennikov IV, Tchikin LD, Efremov RG, Ivanov VT, Arseniev AS. 1999. Spatial structure of the M2 transmembrane segment of the nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *FEBS Lett* 457:117-121.
- Pebay-Peyroula E, Rummel G, Rosenbusch JP, Landau EM. 1997. X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277:1676-1681.
- Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G. 2003. Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* 426:39-44.
- Pedersen SE, Cohen JB. 1990. d-Tubocurarine binding sites are located at alpha-gamma and alpha-delta subunit interfaces of the nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:2785-2789.
- Pedersen SE, Sharp SD, Liu WS, Cohen JB. 1992. Structure of the noncompetitive antagonist-binding site of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. [3H]meproadifen mustard reacts selectively with alpha-subunit Glu-262. *J Biol Chem* 267:10489-10499.

- Pereira EF, Alkondon M, Tano T, Castro NG, Froes-Ferrao MM, Rozental R, Aronstam RS, Schratzenholz A, Maelicke A, Albuquerque EX. 1993. A novel agonist binding site on nicotinic acetylcholine receptors. *J Recept Res* 13:413-436.
- Pereira EF, Hilmas C, Santos MD, Alkondon M, Maelicke A, Albuquerque EX. 2002. Unconventional ligands and modulators of nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:479-500.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-356.
- Petersson EJ, Choi A, Dahan DS, Lester HA, Dougherty DA. 2002. A perturbed pK(a) at the binding site of the nicotinic acetylcholine receptor: implications for nicotine binding. *J Am Chem Soc* 124:12662-12663.
- Popot JL, Changeux JP. 1984. Nicotinic receptor of acetylcholine: structure of an oligomeric integral membrane protein. *Physiol Rev* 64:1162-1239.
- Pratt MB, Husain SS, Miller KW, Cohen JB. 2000. Identification of sites of incorporation in the nicotinic acetylcholine receptor of a photoactivatable general anesthetic. *J Biol Chem* 275:29441-29451.
- Pratt MB, Pedersen SE, Cohen JB. 2000. Identification of the sites of incorporation of [3H]ethidium diazide within the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *Biochemistry* 39:11452-11462.
- Price KL, Lummis SC. 2004. The role of tyrosine residues in the extracellular domain of the 5-hydroxytryptamine₃ receptor. *J Biol Chem* 279:23294-23301.
- Prince RJ, Sine SM. 1996. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor. Identification of residues that determine agonist selectivity. *J Biol Chem* 271:25770-25777.
- Prince RJ, Sine SM. 1998. Epibatidine binds with unique site and state selectivity to muscle nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 273:7843-7849.
- Psaridi-Linardaki L, Mamalaki A, Remoundos M, Tzartos SJ. 2002. Expression of soluble ligand- and antibody-binding extracellular domain of human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in yeast *Pichia pastoris*. Role of glycosylation in alpha-bungarotoxin binding. *J Biol Chem* 277:26980-26986.

Q

- Quick MW, Lester RA. 2002. Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53:457-478.

R

- Raines DE, Krishnan NS. 1998. Transient low-affinity agonist binding to Torpedo postsynaptic membranes resolved by using sequential mixing stopped-flow fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 37:956-964.
- Ramirez-Latorre J, Yu CR, Qu X, Perin F, Karlin A, Role L. 1996. Functional contributions of alpha5 subunit to neuronal acetylcholine receptor channels. *Nature* 380:347-351.
- Rana TM, Meares CF. 1991. Transfer of oxygen from an artificial protease to peptide carbon during proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:10578-10582.
- Ranganathan R, Cannon SC, Horvitz HR. 2000. MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408:470-475.

- Reeves DC, Sayed MF, Chau PL, Price KL, Lummis SC. 2003. Prediction of 5-HT₃ receptor agonist-binding residues using homology modeling. *Biophys J* 84:2338-2344.
- Reitstetter R, Lukas RJ, Gruener R. 1999. Dependence of nicotinic acetylcholine receptor recovery from desensitization on the duration of agonist exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 289:656-660.
- Revah F, Galzi JL, Giraudat J, Haumont PY, Lederer F, Changeux JP. 1990. The noncompetitive blocker [3H]chlorpromazine labels three amino acids of the acetylcholine receptor gamma subunit: implications for the alpha-helical organization of regions MII and for the structure of the ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4675-4679.
- Revah F, Bertrand D, Galzi JL, Devillers-Thiery A, Mulle C, Hussy N, Bertrand S, Ballivet M, Changeux JP. 1991. Mutations in the channel domain alter desensitization of a neuronal nicotinic receptor. *Nature* 353:846-849.
- Role LW, Berg DK. 1996. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 16:1077-1085.
- Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. 1992. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem* 203:173-179.
- Rozental R, Scoble GT, Albuquerque EX, Idriss M, Sherby S, Sattelle DB, Nakanishi K, Konno K, Eldefrawi AT, Eldefrawi ME. 1989. Allosteric inhibition of nicotinic acetylcholine receptors of vertebrates and insects by philanthotoxin. *J Pharmacol Exp Ther* 249:123-130.
- Rozycka A, Trzeciak WH. 2003. Genetic basis of autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. *J Appl Genet* 44:197-207.
- Ruiz ML, Karpen JW. 1997. Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature* 389:389-392.
- Ryan SE, Demers CN, Chew JP, Baenziger JE. 1996. Structural effects of neutral and anionic lipids on the nicotinic acetylcholine receptor. An infrared difference spectroscopy study. *J Biol Chem* 271:24590-24597.

S

- Saitoh T, Changeux JP. 1980. Phosphorylation in vitro of membrane fragments from *Torpedo marmorata* electric organ. Effect on membrane solubilization by detergents. *Eur J Biochem* 105:51-62.
- Schalk I, Ehret-Sabatier L, Bouet F, Goeldner M, Hirth C. 1994. Trp279 is involved in the binding of quaternary ammonium at the peripheral site of *Torpedo marmorata* acetylcholinesterase. *Eur J Biochem* 219:155-159.
- Schapira M, Abagyan R, Totrov M. 2002. Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isotypes bound to acetylcholine and nicotine. *BMC Struct Biol* 2:1.
- Schirmer T, Keller TA, Wang YF, Rosenbusch JP. 1995. Structural basis for sugar translocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267:512-514.
- Schmidt J, Raftery MA. 1973. A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. *Anal Biochem* 52:349-354.
- Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, et al. 1987. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328:221-227.

- Schrattenholz A, Godovac-Zimmermann J, Schafer HJ, Albuquerque EX, Maelicke A. 1993. Photoaffinity labeling of Torpedo acetylcholine receptor by physostigmine. *Eur J Biochem* 216:671-677.
- Schrattenholz A, Pereira EF, Roth U, Weber KH, Albuquerque EX, Maelicke A. 1996. Agonist responses of neuronal nicotinic acetylcholine receptors are potentiated by a novel class of allosterically acting ligands. *Mol Pharmacol* 49:1-6.
- Schrattenholz A, Roth U, Godovac-Zimmermann J, Maelicke A. 1997. Mapping of a binding site for ATP within the extracellular region of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor beta-subunit. *Biochemistry* 36:13333-13340.
- Schrattenholz A, Pfeiffer S, Pejovic V, Rudolph R, Godovac-Zimmermann J, Maelicke A. 1998. Expression and renaturation of the N-terminal extracellular domain of torpedo nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunit. *J Biol Chem* 273:32393-32399.
- Severance E, Zhang H, Cruz Y, Pakhlevanians S, Hadley SH, Amin J, Wecker L, Reed C, Cuevas J. 2004. THE α 7 NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR SUBUNIT EXISTS IN TWO ISOFORMS THAT CONTRIBUTE TO FUNCTIONAL LIGAND-GATED ION CHANNELS*. *Mol Pharmacol*.
- Sgard F, Charpentier E, Bertrand S, Walker N, Caput D, Graham D, Bertrand D, Besnard F. 2002. A novel human nicotinic receptor subunit, α 10, that confers functionality to the α 9-subunit. *Mol Pharmacol* 61:150-159.
- Shao Z, Mellor IR, Brierley MJ, Harris J, Usherwood PN. 1998. Potentiation and inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by spermine in the TE671 human muscle cell line. *J Pharmacol Exp Ther* 286:1269-1276.
- Shaw KP, Aracava Y, Akaike A, Daly JW, Rickett DL, Albuquerque EX. 1985. The reversible cholinesterase inhibitor physostigmine has channel-blocking and agonist effects on the acetylcholine receptor-ion channel complex. *Mol Pharmacol* 28:527-538.
- Shen XM, Ohno K, Tsujino A, Brengman JM, Gingold M, Sine SM, Engel AG. 2003. Mutation causing severe myasthenia reveals functional asymmetry of AChR signature cystine loops in agonist binding and gating. *J Clin Invest* 111:497-505.
- Simasko SM, Soares JR, Weiland GA. 1986. Two components of carbamylcholine-induced loss of nicotinic acetylcholine receptor function in the neuronal cell line PC12. *Mol Pharmacol* 30:6-12.
- Simasko SM, Durkin JA, Weiland GA. 1987. Effects of substance P on nicotinic acetylcholine receptor function in PC12 cells. *J Neurochem* 49:253-260.
- Sine SM. 1993. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of residues that determine curare selectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:9436-9440.
- Sine SM, Quiram P, Papanikolaou F, Kreienkamp HJ, Taylor P. 1994. Conserved tyrosines in the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor stabilize quaternary ammonium groups of agonists and curariform antagonists. *J Biol Chem* 269:8808-8816.
- Sine SM, Kreienkamp HJ, Bren N, Maeda R, Taylor P. 1995. Molecular dissection of subunit interfaces in the acetylcholine receptor: identification of determinants of alpha-conotoxin M1 selectivity. *Neuron* 15:205-211.
- Sine SM, Ohno K, Bouzat C, Auerbach A, Milone M, Pruitt JN, Engel AG. 1995. Mutation of the acetylcholine receptor alpha subunit causes a slow-channel myasthenic syndrome by enhancing agonist binding affinity. *Neuron* 15:229-239.
- Sine SM, Wang HL, Bren N. 2002. Lysine scanning mutagenesis delineates structural model of the nicotinic receptor ligand binding domain. *J Biol Chem* 277:29210-29223.

- Sine SM, Wang HL, Gao F. 2004. Toward atomic-scale understanding of ligand recognition in the muscle nicotinic receptor. *Curr Med Chem* 11:559-567.
- Smit AB, Syed NI, Schaap D, van Minnen J, Klumperman J, Kits KS, Lodder H, van der Schors RC, van Elk R, Sorgedraeger B, Brejc K, Sixma TK, Geraerts WP. 2001. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature* 411:261-268.
- Smit AB, Brejc K, Syed N, Sixma TK. 2003. Structure and function of AChBP, homologue of the ligand-binding domain of the nicotinic acetylcholine receptor. *Ann N Y Acad Sci* 998:81-92.
- Sokolova E, Nistri A, Giniatullin R. 2001. Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 21:4958-4968.
- Song L, Hobaugh MR, Shustak C, Cheley S, Bayley H, Gouaux JE. 1996. Structure of staphylococcal alpha-hemolysin, a heptameric transmembrane pore. *Science* 274:1859-1866.
- Song XZ, Pedersen SE. 2000. Electrostatic interactions regulate desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys J* 78:1324-1334.
- Song XZ, Andreeva IE, Pedersen SE. 2003. Site-selective agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry* 42:4197-4207.
- Spivak CE. 1995. Correlations among Hill parameters reflect models of activating ligand-gated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 16:39-42.
- Spura A, Russin TS, Freedman ND, Grant M, McLaughlin JT, Hawrot E. 1999. Probing the agonist domain of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis reveals residues in proximity to the alpha-bungarotoxin binding site. *Biochemistry* 38:4912-4921.
- Stafford GA, Oswald RE, Weiland GA. 1994. The beta subunit of neuronal nicotinic acetylcholine receptors is a determinant of the affinity for substance P inhibition. *Mol Pharmacol* 45:758-762.
- Steinlein OK. 2002. Nicotinic acetylcholine receptors and epilepsy. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1:443-448.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700-1705.
- Storch A, Schrattenholz A, Cooper JC, Abdel Ghani EM, Gutbrod O, Weber KH, Reinhardt S, Lobron C, Hermsen B, Soskic V, et al. 1995. Physostigmine, galanthamine and codeine act as 'noncompetitive nicotinic receptor agonists' on clonal rat pheochromocytoma cells. *Eur J Pharmacol* 290:207-219.
- Stroebel D, Choquet Y, Popot JL, Picot D. 2003. An atypical haem in the cytochrome b(6)f complex. *Nature* 426:413-418.
- Sukharev S, Anishkin A. 2004. Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems? *Trends Neurosci* 27:345-351.
- Sullivan D, Chiara DC, Cohen JB. 2002. Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor by cysteine scanning mutagenesis: antagonist footprint and secondary structure prediction. *Mol Pharmacol* 61:463-472.
- Sullivan DA, Cohen JB. 2000. Mapping the agonist binding site of the nicotinic acetylcholine receptor. Orientation requirements for activation by covalent agonist. *J Biol Chem* 275:12651-12660.

- Sussman JL, Harel M, Frolow F, Oefner C, Goldman A, Toker L, Silman I. 1991. Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* 253:872-879.
- Swope SL, Qu Z, Haganir RL. 1995. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor by protein tyrosine kinases. *Ann N Y Acad Sci* 757:197-214.

T

- Takacs Z, Wilhelmsen KC, Sorota S. 2001. Snake alpha-neurotoxin binding site on the Egyptian cobra (*Naja haje*) nicotinic acetylcholine receptor is conserved. *Mol Biol Evol* 18:1800-1809.
- Tamamizu S, Guzman GR, Santiago J, Rojas LV, McNamee MG, Lasalde-Dominicci JA. 2000. Functional effects of periodic tryptophan substitutions in the alpha M4 transmembrane domain of the *Torpedo californica* nicotinic acetylcholine receptor. *Biochemistry* 39:4666-4673.
- Taylor P, Hansen SB, Talley TT, Hibbs RE, Radic Z. 2004. Contemporary paradigms for cholinergic ligand design guided by biological structure. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1875-1877.
- Tierney ML, Unwin N. 2000. Electron microscopic evidence for the assembly of soluble pentameric extracellular domains of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Mol Biol* 303:185-196.
- Tierney ML, Osborn KE, Milburn PJ, Howitt SM. 2004. Submitted (NOV-2003) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Tonini R, Renzi M, Eusebi F. 2004. Unliganded human mutant alpha 7 nicotinic receptors are modulated by Ca^{2+} and trace levels of Zn^{2+} . *Neuropharmacology* 46:727-733.
- Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. 2000. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 405:647-655.
- Trudell J. 2002. Unique assignment of inter-subunit association in GABA(A) alpha 1 beta 3 gamma 2 receptors determined by molecular modeling. *Biochim Biophys Acta* 1565:91-96.
- Tsetlin VI, Dergousova NI, Azeeva EA, Kryukova EV, Kudelina IA, Shibanova ED, Kasheverov IE, Methfessel C. 2002. Refolding of the *Escherichia coli* expressed extracellular domain of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor. *Eur J Biochem* 269:2801-2809.
- Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-1144.
- Tzartos SJ, Cung MT, Demange P, Loutrari H, Mamalaki A, Marraud M, Papadouli I, Sakarellos C, Tsikaris V. 1991. The main immunogenic region (MIR) of the nicotinic acetylcholine receptor and the anti-MIR antibodies. *Mol Neurobiol* 5:1-29.

U

- Unwin N. 1993. Nicotinic acetylcholine receptor at 9 Å resolution. *J Mol Biol* 229:1101-1124.
- Unwin N. 1995. Acetylcholine receptor channel imaged in the open state. *Nature* 373:37-43.
- Unwin N. 1998. The nicotinic acetylcholine receptor of the *Torpedo electric ray*. *J Struct Biol* 121:181-190.

- Unwin N, Miyazawa A, Li J, Fujiyoshi Y. 2002. Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J Mol Biol* 319:1165-1176.
- Unwin N. 2003. Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett* 555:91-95.

V

- Vailati S, Hanke W, Bejan A, Barabino B, Longhi R, Balestra B, Moretti M, Clementi F, Gotti C. 1999. Functional alpha6-containing nicotinic receptors are present in chick retina. *Mol Pharmacol* 56:11-19.
- Valenzuela CF, Dowding AJ, Arias HR, Johnson DA. 1994. Antibody-induced conformational changes in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor: a fluorescence study. *Biochemistry* 33:6586-6594.
- Valera S, Ballivet M, Bertrand D. 1992. Progesterone modulates a neuronal nicotinic acetylcholine receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:9949-9953.
- Valor LM, Mulet J, Sala F, Sala S, Ballesta JJ, Criado M. 2002. Role of the large cytoplasmic loop of the alpha 7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit in receptor expression and function. *Biochemistry* 41:7931-7938.
- Van den Berg B, Clemons WM, Jr., Collinson I, Modis Y, Hartmann E, Harrison SC, Rapoport TA. 2004. X-ray structure of a protein-conducting channel. *Nature* 427:36-44.
- Vernino S, Amador M, Luetje CW, Patrick J, Dani JA. 1992. Calcium modulation and high calcium permeability of neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Neuron* 8:127-134.
- Villarroel A, Herlitze S, Koenen M, Sakmann B. 1991. Location of a threonine residue in the alpha-subunit M2 transmembrane segment that determines the ion flow through the acetylcholine receptor channel. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 243:69-74.
- Villarroel A, Sakmann B. 1992. Threonine in the selectivity filter of the acetylcholine receptor channel. *Biophys J* 62:196-205; discussion 205-198.

W

- Wagner DA, Czajkowski C. 2001. Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* 21:67-74.
- Waksman G, Fournie-Zaluski MC, Roques B. 1976. Synthesis of fluorescent acyl-cholines with agonistic properties: pharmacological activity on Electrophorus electroplaque and interaction in vitro with Torpedo receptor-rich membrane fragments. *FEBS Lett* 67:335-342.
- Wang D, Chiara DC, Xie Y, Cohen JB. 2000. Probing the structure of the nicotinic acetylcholine receptor with 4-benzoylbenzoylcholine, a novel photoaffinity competitive antagonist. *J Biol Chem* 275:28666-28674.
- Wang F, Gerzanich V, Wells GB, Anand R, Peng X, Keyser K, Lindstrom J. 1996. Assembly of human neuronal nicotinic receptor alpha5 subunits with alpha3, beta2, and beta4 subunits. *J Biol Chem* 271:17656-17665.
- Wang HL, Auerbach A, Bren N, Ohno K, Engel AG, Sine SM. 1997. Mutation in the M1 domain of the acetylcholine receptor alpha subunit decreases the rate of agonist dissociation. *J Gen Physiol* 109:757-766.

- Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. 2000. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 275:5626-5632.
- Wang HY, Lee DH, Davis CB, Shank RP. 2000. Amyloid peptide Abeta(1-42) binds selectively and with picomolar affinity to alpha7 nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem* 75:1155-1161.
- Watty A, Methfessel C, Hucho F. 1997. Fixation of allosteric states of the nicotinic acetylcholine receptor by chemical cross-linking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8202-8207.
- Weber M, Changeux JP. 1974. Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. I. Binding of the tritiated alpha-neurotoxin in the absence of effector. *Mol Pharmacol* 10:1-14.
- Weber M, Changeux JP. 1974. Binding of Naja nigricollis (3H)alpha-toxin to membrane fragments from Electrophorus and Torpedo electric organs. II. Effect of cholinergic agonists and antagonists on the binding of the tritiated alpha-neurotoxin. *Mol Pharmacol* 10:15-34.
- Webster SM, Del Camino D, Dekker JP, Yellen G. 2004. Intracellular gate opening in Shaker K⁺ channels defined by high-affinity metal bridges. *Nature* 428:864-868.
- Weiland G, Frisman D, Taylor P. 1979. Affinity labeling of the subunits of the membrane associated cholinergic receptor. *Mol Pharmacol* 15:213-226.
- Wells GB, Anand R, Wang F, Lindstrom J. 1998. Water-soluble nicotinic acetylcholine receptor formed by alpha7 subunit extracellular domains. *J Biol Chem* 273:964-973.
- West AP, Jr., Bjorkman PJ, Dougherty DA, Lester HA. 1997. Expression and circular dichroism studies of the extracellular domain of the alpha subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *J Biol Chem* 272:25468-25473.
- White BH, Cohen JB. 1992. Agonist-induced changes in the structure of the acetylcholine receptor M2 regions revealed by photoincorporation of an uncharged nicotinic noncompetitive antagonist. *J Biol Chem* 267:15770-15783.
- Whittaker VP. 1998. Arcachon and cholinergic transmission. *J Physiol Paris* 92:53-57.
- Williamson PT, Meier BH, Watts A. 2004. Structural and functional studies of the nicotinic acetylcholine receptor by solid-state NMR. *Eur Biophys J*.
- Wilson G, Karlin A. 2001. Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1241-1248.

X

- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60-66.

Y

- Yankovskaya V, Horsefield R, Tornroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Leger C, Byrne B, Cecchini G, Iwata S. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:700-704.

- Yao Y, Wang J, Viroonchatapan N, Samson A, Chill J, Rothe E, Anglister J, Wang ZZ. 2002. Yeast expression and NMR analysis of the extracellular domain of muscle nicotinic acetylcholine receptor alpha subunit. *J Biol Chem* 277:12613-12621.
- Yu EW, McDermott G, Zgurskaya HI, Nikaido H, Koshland DE, Jr. 2003. Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump. *Science* 300:976-980.
- Yushmanov VE, Xu Y, Tang P. 2003. NMR structure and dynamics of the second transmembrane domain of the neuronal acetylcholine receptor beta 2 subunit. *Biochemistry* 42:13058-13065.

Z

- Zacharias N, Dougherty DA. 2002. Cation-pi interactions in ligand recognition and catalysis. *Trends Pharmacol Sci* 23:281-287.
- Zhang H, Karlin A. 1997. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the M1 segment of the beta-subunit. *Biochemistry* 36:15856-15864.
- Zhang H, Karlin A. 1998. Contribution of the beta subunit M2 segment to the ion-conducting pathway of the acetylcholine receptor. *Biochemistry* 37:7952-7964.
- Zhong W, Gallivan JP, Zhang Y, Li L, Lester HA, Dougherty DA. 1998. From ab initio quantum mechanics to molecular neurobiology: a cation-pi binding site in the nicotinic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12088-12093.
- Zouni A, Witt HT, Kern J, Fromme P, Krauss N, Saenger W, Orth P. 2001. Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature* 409:739-743.
- Zwart R, van Kleef RG, Gotti C, Smulders CJ, Vijverberg HP. 2000. Competitive potentiation of acetylcholine effects on neuronal nicotinic receptors by acetylcholinesterase-inhibiting drugs. *J Neurochem* 75:2492-2500.

Sites Internet d'intérêt

Sites bibliographiques

<http://vivisimo.com/clustermed>

Un outil en plus à l'incontournable PubMed. Ce site va chercher dans les bases de données de PubMed mais organise les résultats en clusters pour plus de clarté.

Sites sur les récepteurs Ionotropes

<http://www.ebi.ac.uk/compneur-srv/LGICdb/LGIC.html>

Ce site est une base de donnée régulièrement mise à jour concernant tous les récepteurs ionotropes. Elle comprend toutes les séquences nucléiques et protéiques des différentes sous-unités, quelques alignements multiples, plusieurs arbres phylogénétiques et les coordonnées atomiques disponibles (structures cristallographiques ou modèles moléculaires).

<http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/chan.html>

Un site sur les maladies associées aux canaux ioniques

Site sur les protéines membranaires.

<http://blanco.biomol.uci.edu/WWWResources.html>

De nombreux liens utiles concernant les aspects biophysiques et structuraux des protéines membranaires.

<http://www.mpibp-frankfurt.mpg.de/michel/public/memprotstruct.html>

http://blanco.biomol.uci.edu/Membrane_Proteins_xtal.html

Deux sites recensant toutes les protéines membranaires de structure atomique élucidée.

<http://info.bio.cmu.edu/Courses/BiochemMols/Channels/channelsIntro.htm>

Site sur les structures des canaux et pompes membranaires

Site sur la pharmacologie

<http://pdsp.cwru.edu/>

Banque de données, malheureusement non exhaustive, rassemblant environ 29 000 constantes d'inhibitions de liaison (Ki) de molécules chimiques sur de nombreux récepteurs ionotropes, GPCRs, transporteurs et enzymes.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

New and convenient synthesis of a tritiated photoactivatable nicotinic agonist: [3H]–AC5

A.Mourot, F. Kotzyba-Hibert, E. Doris and M. Goeldner

Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals, 2002, vol. 45, n°11, pages 943 – 953

Pages 943 – 953 :

- La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.
- Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/abstract/98015773/ABSTRACT>

- Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP:

peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Les articles présentés ici sont extraits d'un ouvrage soumis à des droits détenus par un éditeur commercial :

- **Site-directed reactive probes for structural and functional investigation of cholinergic proteins**

C.Che, T.Grutter, **A.Mouro**t, F.Kotzyba-Hibert and M.Goeldner, XIth Cholinergic Mechanisms Symposium, A.Fisher and H.Soreq Eds, Martin Dunitz Ltd, London, 2004, 39-49

- **Mapping the acetylcholine binding sites of Torpedo nicotinic receptor using photoaffinity labeling: past, present and future**

F.Kotzyba-Hibert, **A.Mouro**t, T.Grutter and M.Goeldner, XIth Cholinergic Mechanisms Symposium, A.Fisher and H.Soreq Eds, Martin Dunitz Ltd, London, 2004, 607-609

Il est possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Communication in preparation for Journal of Molecular Biology.
Electrophysiology experiments in progress.

Probing the reorganization of the nicotinic acetylcholine receptor during desensitization using [³H]AC5, a photoactivatable agonist.

A. Mourot^{1*}, F. Kotzyba-Hibert¹, J. Rodrigo², S. Bertrand³, D. Bertrand³, M. Goeldner¹

¹ Laboratoire de Chimie Bioorganique - UMR 7514 CNRS
Faculté de Pharmacie - Université Louis Pasteur Strasbourg
BP 24 67401 ILLKIRCH Cedex
France

² Laboratoire de Bioinformatique du Médicament, UMR 7081 CNRS
Faculté de Pharmacie - Université Louis Pasteur Strasbourg
BP 24 67401 ILLKIRCH Cedex
France

³ Laboratoire de Physiologie
CMU Faculté de Médecine
CH 1211 Geneva Switzerland

* E-mail adress of the corresponding author: mourot@bioorga.u-strasbg.fr

Summary:

The study of the structural reorganization occurring on the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) during gating and subsequent desensitization has been investigated through time-resolved photoaffinity labeling using a photoactivatable nicotinic agonist: [³H]AC5. This molecule is a photosensitive nicotinic probe displaying high affinity for the desensitized state of the torpedo nAChR ($K_D = 5\text{nM}$) as well as powerful agonist activity on the torpedo nAChR expressed in oocytes ($EC_{50} =$). Its chemical structure, directly related to the fluorescent probe dansyl-C₆-choline, suggests an interaction with the receptor at the α/γ , α/δ subunits interfaces. Photoaffinity labeling of the Torpedo receptor in the desensitized state showed a predominant specific labeling of both γ and δ subunits, while the α subunit was barely labeled. Using a stopped-flow device combined with a flash photolysis quenching system, we investigated the mapping of the subunits in function of incubation time of the receptor with 500 nM [³H]AC5. Going from shorter (17 ms) to longer incubation times (1.25 h), until the final desensitized state is reached, the relative repartition of labeling indicates a progressive evolution from a predominant labeling of $\alpha + \gamma$ subunits towards the labeling of $\gamma + \delta$ subunits. Noticeably, the incorporation of radioactivity in the γ and δ subunits as a function of incubation time shows a monoexponential increase with similar time constants (0.016 s^{-1}). AC5 docking into the $\alpha\gamma$ and $\alpha\delta$ binding sites of the molecular model of *Torpedo marmorata* nAChR fits very well with the D-state photolabeling pattern. Altogether this study suggests a subunit reorganization where, during desensitization, the δ and γ subunits move closer to the photosensitive moiety of AC5 leading to a tightly packed subunit arrangement which corresponds to a stable high affinity state for agonists.

Abbreviations used

[¹²⁵I]α-Bg-tx : iodinated α-bungarotoxin; ACh : acetylcholine ; AChBP : acetylcholine binding protein ; CCh : carbamylcholine ; DIFP : diisopropyl phosphofluoridate ; Dns-C₆-Ch : Dansyl-C₆-Choline ; GOLD : Genetic Optimisation for Ligand Docking ; LBD : ligand binding domain ; nAChR : nicotinic acetylcholine receptor ; PEI : polyethylene imine

Introduction

The nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) from fish electric organs and vertebrate neuromuscular junctions is a well-characterized transmembrane allosteric protein composed of four polypeptides chains assembled into a heterologous pentamer α₂βγδ that carries the acetylcholine (ACh) binding sites and contains the cation-selective channel forming elements. nAChR is a protein of the cys-loop family that undergoes allosteric transitions upon agonist binding, which involves at least three transitory states. Exposure to an agonist such as acetylcholine leads to a rapid (ms) opening of the channel, causing depolarization of the membrane, followed by subsequent fast (ms-s) and slow (s-min) processes of desensitization¹. This molecular phenomenon plays a key role in the regulation of the synaptic transmission, and can be perturbed by natural mutations or allosteric effectors².

Recently, the structure of a homopentameric homologue of the N-terminal extracellular domain of the nicotinic receptor, AChBP expressed in the glial cells in the brain of the snail *Lymnaea stagnalis*, revealed the atomic arrangement of the amino acids that frame the ligand binding site of nicotinic receptors^{3,4}. Moreover, refined cryoelectron microscopic analyses of two-dimensional crystalline arrays of nAChRs provide the three-dimensional structure of the membrane embedded domain approaching 4 Å resolution⁵. Both structural analyses showed that the protein subunits display predominantly β-sheet folding in the ligand-binding domain (LBD) and α-helical folding in the pore domain, and thus allowing us to address the key question of the structural reorganization of the receptor during gating and desensitization. Near-atomic-scale changes in the structure between closed and open channel states were found both in the extracellular region⁶ and in the pore domain, giving rise to a tentative molecular model for the gating mechanisms⁵. Mutational and chemical approaches have been developed on the cys-loop family to investigate further the molecular motions occurring inside the ion pore⁷⁻⁹ and at the membrane-LBD interface¹⁰⁻¹⁴; for review see¹⁵⁻¹⁷. However, little effort has been made to investigate the conformational transitions within and nearby the agonist binding site during activation and subsequent desensitization¹⁸.

Topographical mapping of residues contributing to the ACh binding sites of *Torpedo* nAChR was achieved with different site-directed antagonist or agonist probes. Over two decades of biochemical investigation led to the identification of three discontinuous domains on the α subunits (binding segments A, B and C) with additional residues on the γ and δ subunits (binding segments D, E and F). This six binding-segment-domain model fits quite nicely with the three dimensional positioning of the homologous residues in AChBP¹⁹. However, little is known about the structural dynamics of the functioning receptor. Using time-resolved photolabeling methods, structural reorganization occurring at the acetylcholine binding domains upon desensitization were studied at the molecular level, first with the antagonist [³H]DDF²⁰, and more recently with the agonist [³H]DCTA²¹.

Dynamic photoaffinity labeling combines the power of photochemical covalent bond formation with rapid mixing techniques. A stopped-flow mixing device adapted with a photochemical quenching system was used to analyze the structural reorganization at the ACh binding site. Quantification of radioactivity incorporation into the receptor subunits as a function

of mixing time of [^3H]DCTA with the receptor, allowed the visualization of the macromolecular conformational changes occurring at the receptor level. The labeling analyses suggest that during the slow transition of the receptor, going from the intermediate to the desensitized state, the binding segments forming the ACh binding site on the α - and γ - subunits move closer to each other²¹. In order to extend this analysis to the α/γ and α/δ interfaces, we used [^3H]AC5, molecule which was shown to be a potent photoactivatable agonist²². AC5 is structurally related to the fluorescent agonist dansyl-C₆-choline (Dns-C₆-Ch)²³, a probe which has been used at first to characterize the different states of the nicotinic receptor²⁴⁻²⁶ and more recently to determine binding characteristics of the $\alpha\gamma$ and $\alpha\delta$ binding sites^{27,28}.

In this article, we describe dynamic photolabeling of the *Torpedo marmorata* nAChR using [^3H]AC5 to analyze the $\alpha\gamma$ and $\alpha\delta$ subunit interfaces in order to gain a new insight into the reorganization of the nAChR subunits upon activation.

Biochemical and functional properties of [^3H]AC5:

Chemical structure

Figure 1 illustrates the relationship between the chemical structures of AC5 and Dns-C₆-Ch²³. Both molecules carry an acylcholine moiety attached through a similar spacer either to the fluorescent dansyl chromophore or to the photosensitive aromatic diazonium salt in AC5. These two molecules are expected to interact similarly with the receptor, anchoring first in the ACh binding site and probing subsequently identical areas through their aromatic moieties. From this working hypothesis it will be possible to correlate fluorescence analyses with dynamic photochemical mapping studies during the functioning of the receptor, probing in particular the $\alpha\gamma$ and $\alpha\delta$ subunit interfaces. The time-resolved photochemical labeling studies use a stopped-flow apparatus connected to a photochemical quenching system, which has been described previously²¹. [^3H]AC5 (0,7-0,9 Ci/mmol) was synthesized and purified with new experimental conditions²⁹.

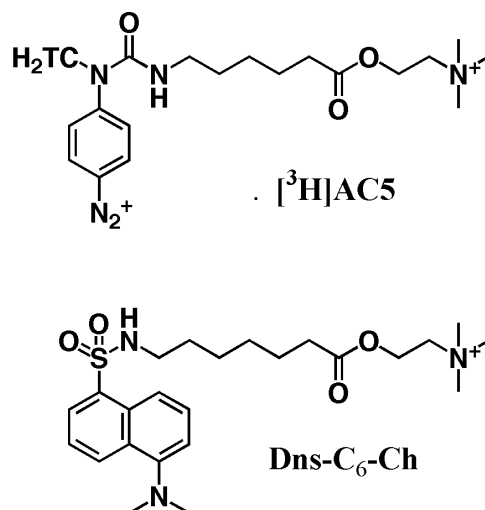


Figure 1: Chemical structures of two nicotinic agonist probes : the photosensitive tritiated [^3H]AC5 and the fluorescent Dns-C₆-Ch.

[^3H]AC5 binds with high affinity to the ACh binding sites:

Previous competition experiments against [125 I] α -Bg-tx initial binding rate have shown that non-labeled AC5 binds with high affinity (9 nM) to the ACh binding site²². Here, we extend the study by measuring the equilibrium binding of [3 H]AC5 on nAChR rich membranes (3-4 nmol [125 I] α -Bg-tx binding sites / mg of protein). The experiments were performed in the dark, in presence of the esterase inhibitor DIFP and proadifen to desensitize the nAChR, while non-specific labeling was measured in presence of saturating concentration of CCh (Figure 2). The specific binding fitted well with a simple hyperbolic function characterized by $K_d = 5$ nM and the concentration of [3 H]AC5 binding sites (3.5 nM) was close to the concentration of [125 I] α -Bg-tx binding sites (4 nM). The Hill number close to 1 is characteristic of a single class of binding sites.

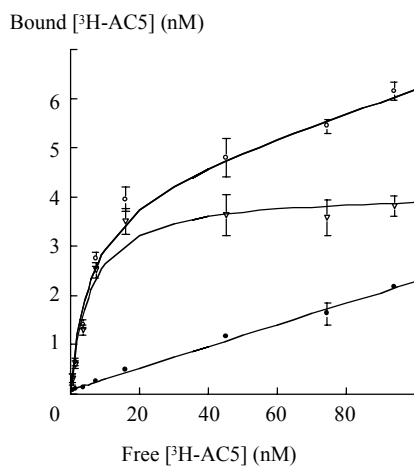


Figure 2: [3 H]AC5 binding essay: nAChR rich membranes were isolated with alkali treatment from *Torpedo marmorata* electric organs as described previously^{30,31}. The final membrane suspension contains 3–4 nmol of α -Bg-tx binding sites per mg of protein, as determined by modified Lowry method³² and by saturation experiment with [125 I] α -Bg-tx³³. The equilibrium binding of [3 H]AC5 to nAChR rich membranes was measured in the dark at room temperature. The membranes (4 nM [125 I] α -Bg-tx binding sites) were equilibrated with 15 μ M proadifen (to desensitize the nAChR) and 250 μ M DIFP (to inhibit cholinesterase activity) for 50 minutes in a 10 mM NaPi, 150 mM NaCl, pH 7.2 buffer containing the protease inhibitor cocktail. Samples were then incubated for 30 minutes with different concentrations of [3 H]AC5 (1-100 nM), rapidly quenched by 2.5 ml of the same buffer and filtered on GF-C glass fiber filters saturated with 0.3% PEI. Nonspecific binding was determined in the presence

of 100 μ M CCh added 30 minutes before [3 H]AC5. Equilibrium binding data were fit to a single-site model with a linear, nonspecific binding component with the equation:

$$B(x) = \left(\frac{B_{\max} \times x}{K_{eq} + x} \right)^{n_H} + u \times x$$

where $B(x)$ is the [3 H]AC5 bound at a free concentration x ; $B_{\max}$ is the concentration of [3 H]AC5 binding sites; K_{eq} is the dissociation constant; n_H is the Hill number; and u is the slope for non-specific binding.

AC5 is a potent *Torpedo* nicotinic agonist :

Photoaffinity labeling using [3 H]AC5:

Predominant labeling of the γ and δ subunits of the nAChR in the desensitized state (Figure 3)

In a first series of experiments, photolabeling studies were carried out on nAChR rich membranes (3-4 nmoles [125 I] α -Bg-tx binding sites / mg of protein) in presence of the desensitizing non-competitive antagonist proadifen and with the esterase inhibitor DIFP. The concentration of [3 H]AC5 (500 nM) was sufficient to occupy at least 98% of the agonist binding sites at equilibrium. UV-irradiation (385 nm) of the complex resulted in a specific covalent incorporation of radioactivity mainly in the δ (40 – 45 % of the specific incorporation, 65 – 75

% protection by 100 μ M CCh) and γ subunits (52 – 57 % of the specific incorporation, 70 – 80 % protection by 100 μ M CCh). The labeling of the α subunit was very low and only partially protectable (1 – 3 % of the specific incorporation, 15 – 25 % protection by 100 μ M CCh). The negligible specific incorporation found at the level of the β subunit most probably arose from partial proteolysis of the γ subunit (not shown) rather than direct labeling of the β subunit. [3 H]AC5 (500 nM) specifically labels 6 to 7 % of the ACh binding sites at equilibrium. In the absence of light, no detectable specific labeling was observed (not shown).

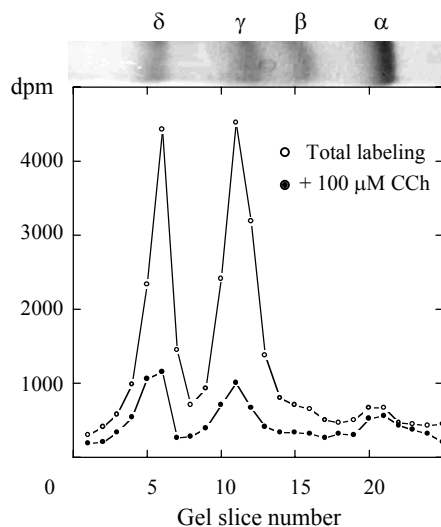


Figure 3 : Analytical photolabeling of nAChR at equilibrium with [3 H]AC5: nAChR rich membranes (200 pmoles, 400 nM) were equilibrated with 15 μ M proadifen and 250 μ M DIFP for 45 minutes at 4°C in 500 μ l of a 10 mM NaPi, 150 mM NaCl, pH 7.2 buffer containing protease inhibitor cocktail. Then 500 nM [3 H]AC5 was incubated for 15 minutes with the membranes prior to photolysis. Protection experiments were carried out with pre-addition of 100 μ M CCh 30 minutes at 4°C. Samples were then irradiated for 15 minutes at 385 nm, 40 μ V, 10 °C. Following irradiation, photolabeled nAChRs were recovered after one-step centrifugation (11 000g, 30 min, 4°C) and pellets were solubilized for 30 minutes at 30°C in the Laemmli sample buffer. The samples were loaded on an 8% SDS-PAGE and radioactivity incorporated in each subunit was quantified as previously described by scintillation counting of excised gel pieces³⁴.

[3 H]AC5 specific incorporation is highly dependent on the mixing-time with *Torpedo* membranes:

We analyzed the incorporation of [3 H]AC5 on nAChR rich membranes as a function of mixing time, which ranged from 17 ms to 1.25 hour. In the absence of any effector, the nAChR of *Torpedo* is in equilibrium between the low affinity resting state and the high affinity desensitized state. Fluorescence experiments with Dns-C₆-Cho evaluated the rate of desensitized nAChR to be 17 – 20 %²⁴. In order to avoid any labeling of the nAChR on the D state, we rapidly (450 ms) mixed the membranes with a low concentration (600 nM) of ACh to occupy the preexisting high affinity sites. For mixing times shorter than 1 s, the radioactivity is mainly incorporated into the α (43 – 52 % of the specific labeling) and γ subunits (43 – 56 % of the specific labeling) and to a smaller extent into the δ subunit (0 – 12 %) (Figure 4A). Labeling is protectable (30 – 70 %) on all three subunits by 500 μ M CCh. Less than 1 % (0.4 – 1 %) of the ACh binding sites are specifically alkylated with such short mixing times. For mixing times longer than 300 s, the radioactivity is mainly incorporated into the γ (50 – 56 % of the specific labeling, 80 – 90 % protection by 500 μ M CCh) and δ subunits (37 – 46 % of the specific labeling, 80 – 90 % protection by 500 μ M CCh) with a minor labeling of the α subunit (4 – 8 % of the specific labeling, 30 – 50 % protection by 500 μ M CCh). In these conditions, photoaffinity yields were increased about ten fold (5.4 – 7.4 %). These values were very close to those found for photolabeling of the nAChR desensitized by proadifen (at equilibrium or via the rapid mixing device). For intermediate mixing times (1-300 s), there is a progressive enhancement of the photolabeling yield, concomitantly on the δ and γ subunits, which results in an evolution of the relative subunit repartition of the labeling shown in figure 4A. The γ and δ

labeling follow a monoexponential increase and the half life of this process can be estimated to be ~ 40 s (Figure 4B). For the α subunit, the experimental errors were too big to allow a confident fitting of a curve. In the absence of light, no detectable specific labeling was observed (data not shown).

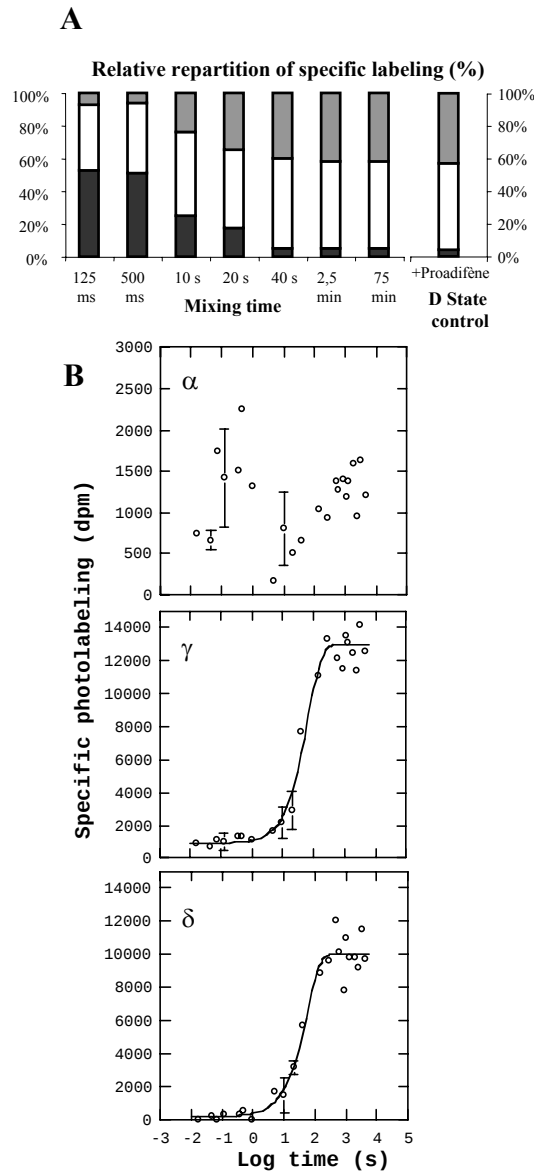


Figure 4: Analytical dynamic photolabeling with $[^3\text{H}]\text{AC5}$: Dynamic photolabeling was performed in the rapid mixing system maintained at 10°C using the same buffer as for photolabeling at equilibrium. nAChR rich membranes (650 nM concentration in delay loop 1) were first incubated or not with ACh (600 nM final concentration in Loop 1) for 450 ms to saturate approximately 20 % of pre-existing high affinity binding sites in the absence of any effector molecule²⁰. This solution (325 nM final concentration of ACh binding sites in delay loop 2) was mixed with $[^3\text{H}]\text{AC5}$ (500 nM final concentration in delay loop 2) for a chosen mixing time and irradiated. A 1 to 2 ml.s^{-1} flow was chosen, which corresponds to an irradiation time of less than 30 ms. We have verified that in these irradiation conditions, more than 90 % of the AC5 was photolyzed (data not shown). For analytical photolabeling of the nAChR desensitized by proadifen, the membranes (1.3 μM binding site) were first incubated 45 minutes with 15 μM proadifen at 4°C before being loaded into the syringe 1. Protection experiments were carried out by mixing the membranes (650 nM concentration in delay loop 1) 450 ms with CCh (500 μM final concentration in delay loop 1) prior to $[^3\text{H}]\text{AC5}$ incubation. The samples were then collected in the collection syringe, centrifuged (11 000 rpm, 30 minutes, 4°C), solubilized 30 minutes in Laemmli buffer and loaded onto an 8% SDS-PAGE. The quantification of the radioactivity was performed as described above for photolabeling at equilibrium. **(A)** Relative repartition of specific labeling (L_r): $L_{r\text{tot}} = L_{r\alpha} (\text{black}) + L_{r\gamma} (\text{white}) + L_{r\delta} (\text{grey}) = 100\%$. **(B)** Absolute specific incorporation of radioactivity into the α , γ and δ subunits, which can be analyzed on γ and δ subunits with the monoexponential equation: $L(t) = L_{\text{max}} [1 - \exp(-k_{\text{app}}t)] + L_{\text{min}}$, with L_{max} and L_{min} being the maximum and minimum of the specific labeling respectively, and k_{app} the pseudo-first order time constant ($k_{\text{app}} = \ln 2/t_{1/2}$). ($n = 1-3$).

Subunit reorganisation during desensitization

It has been suggested that the tight AChBP structure corresponds to a high affinity, open or desensitized, state of the nAChR^{6,35}. In order to confirm this hypothesis, we built a homology model of the *Torpedo* nAChR based on AChBP structure (Protein Data Bank ID code 1I19)³. We've used the approach of comparative modeling based on a template of known structure. This approach is still the best available when a homolog of the target is known. However, it is important to keep in mind the limitations inherent in a modeling process built on a sequence identity inferior to 30 % between the template and the target³⁶. Because of its sequence similarity to all Ligand-Gated Ion Channels (LGICs), that is between 15 and 28% identity, the crystal structure of Acetylcholine-Binding Protein is the established model for the extracellular

domain of the pentameric LGICs. Up to now, several homology models have been generated to analyze receptor-ligand interactions^{35,37}. We've used the docking program GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking, Version. 2.1)³⁸ in order to dock AC5 to each binding site. GOLD is an automated ligand docking program that uses a genetic algorithm to explore the full range of ligand conformational flexibility with partial flexibility of the protein, and satisfies the fundamental requirement that the ligand must displace loosely bound water upon binding. The automated docking of AC5 in both ligand-binding pockets led to a position consistent with labeling and mutagenesis experiments¹⁹. More in detail, the quaternary ammonium of AC5 makes a π -cation interaction with α Trp149 while the rest of the molecule is oriented to the hypothetical route of ligand access³ (Figure 5). The photoreactive aryldiazonium of AC5 (situated around 14 Å from the trimethylammonium moiety) is located out of the agonist binding site, close to the complementary (i.e. the γ or δ) subunit.



Figure 5: AC5 probe orientation into the $\alpha\gamma$ binding site. A homology model of the *Torpedo californica* nAChR was constructed from the crystal structure of AChBP³. Briefly, the initial homomeric ($\alpha 7$)₅ was modeled on the basis of the crystal structure of AChBP using the version 6 of the program MODELLER³⁹ and posteriorly energy minimizations were performed in DEEP-VIEW with GROMOS 96 parameters (<http://igc.ethz.ch/gromos>). In this context, we retrieved from the Ligand-Gated Ion Channel Database (<http://www.pasteur.fr/recherche/banques/LGIC/LGIC.html>) the 3-D model of the extracellular domain of *Torpedo californica*. This initial model was refined again with energy minimizations using the force-field implemented in AMBER (7.0)⁴⁰. AC5 was built using the program ChemDraw and translated to 3-D using Concord program. A short minimization was performed in Sybyl (TRIPOS) and posteriorly the molecule was protonated. The module Biopolymer of Sybyl was used to save in different files the subunits (α_1 - γ) and (α_2 - δ). For each file, all possible channels

and cavities were detected using the MOLCAD module (Multi channel function) of the SYBYL package. Connolly surfaces and channels were calculated using a 1.4-Å radius probe. The biggest cavity was finally selected and its surface computed. We've used the docking program GOLD³⁸ in order to dock AC5 to each binding site. The α (black) and γ (grey) subunits are shown in ribbon representation, and AC5 molecule in ball and stick representation.

This static model is substantiated by the observed predominant labeling of the γ and δ subunits on the desensitized nAChR by [³H]AC5. According to our model, AC5's photosensitive part appears outside of the protein, which explains the relatively small amount of alkylated binding sites, compared to other aryldiazonium photosensitive probes³⁴. Furthermore, a significant labeling of the α subunit requires that the AC5 molecule be less tightly bound to the ACh binding site, offering a higher degree of flexibility. We thus propose that, during the slow (s-min) desensitization process, the nAChR undergoes a quaternary reorganization, leading to a more compact structure and a tighter agonist binding site. The concomitant enhancement of photolabeling on the γ and δ subunits suggests a concerted rotation of all five subunits, in agreement with the MWC theory of allosteric transitions¹, associated with an enhancement of the agonists affinity²⁴. This rotation would bring the aromatic part of AC5 closer to the γ and δ subunits. The slow fluorescence relaxation process (around 30 s) observed with Dns-C₆-Ch²⁴ can now be explained in terms of a proximity between the dansyl fluorophore and the γ or δ subunit.

The recent cDNA cloning of the *Torpedo marmorata* β , γ and δ subunits⁴¹ will allow us to analyse, at the amino acid level, the AC5 photoincorporation during the nAChR desensitization process. This work is in progress.

Acknowledgements

The authors thank the Association Française contre les Myopathies for its support and A.M. for a fellowship. CNRS and the Université Louis Pasteur are acknowledged for their financial contribution. We would also like to thank Johnathan B. Cohen for providing us the *Torpedo californica* cDNAs.

References

1. Changeux, J. P. & Edelstein, S. J. (1998). Allosteric receptors after 30 years. *Neuron* 21, 959-80.
2. Quick, M. W. & Lester, R. A. (2002). Desensitization of neuronal nicotinic receptors. *J Neurobiol* 53, 457-78.
3. Brejc, K., van Dijk, W. J., Klaassen, R. V., Schuurmans, M., van Der Oost, J., Smit, A. B. & Sixma, T. K. (2001). Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature* 411, 269-76.
4. Celie, P. H., van Rossum-Fikkert, S. E., van Dijk, W. J., Brejc, K., Smit, A. B. & Sixma, T. K. (2004). Nicotine and carbamylcholine binding to nicotinic acetylcholine receptors as studied in AChBP crystal structures. *Neuron* 41, 907-14.
5. Miyazawa, A., Fujiyoshi, Y. & Unwin, N. (2003). Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature* 423, 949-55.
6. Unwin, N., Miyazawa, A., Li, J. & Fujiyoshi, Y. (2002). Activation of the nicotinic acetylcholine receptor involves a switch in conformation of the alpha subunits. *J Mol Biol* 319, 1165-76.
7. Wilson, G. & Karlin, A. (2001). Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 1241-8.
8. Horenstein, J., Wagner, D. A., Czajkowski, C. & Akabas, M. H. (2001). Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment. *Nat Neurosci* 4, 477-85.
9. Cymes, G. D., Grosman, C. & Auerbach, A. (2002). Structure of the transition state of gating in the acetylcholine receptor channel pore: a phi-value analysis. *Biochemistry* 41, 5548-55.
10. Grosman, C., Zhou, M. & Auerbach, A. (2000). Mapping the conformational wave of acetylcholine receptor channel gating. *Nature* 403, 773-6.
11. Chakrapani, S., Bailey, T. D. & Auerbach, A. (2004). Gating dynamics of the acetylcholine receptor extracellular domain. *J Gen Physiol* 123, 341-56.
12. Leite, J. F., Blanton, M. P., Shahgholi, M., Dougherty, D. A. & Lester, H. A. (2003). Conformation-dependent hydrophobic photolabeling of the nicotinic receptor: electrophysiology-coordinated photochemistry and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13054-9.
13. Kash, T. L., Jenkins, A., Kelley, J. C., Trudell, J. R. & Harrison, N. L. (2003). Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA(A) receptor. *Nature* 421, 272-5.
14. Absalom, N. L., Lewis, T. M., Kaplan, W., Pierce, K. D. & Schofield, P. R. (2003). Role of charged residues in coupling ligand binding and channel activation in the extracellular domain of the glycine receptor. *J Biol Chem* 278, 50151-7.
15. Lester, H. A., Dibas, M. I., Dahan, D. S., Leite, J. F. & Dougherty, D. A. (2004). Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosci* 27, 329-36.
16. Connolly, C. N. & Wafford, K. A. (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem Soc Trans* 32, 529-34.
17. Absalom, N. L., Lewis, T. M. & Schofield, P. R. (2004). Mechanisms of channel gating of the ligand-gated ion channel superfamily inferred from protein structure. *Exp Physiol* 89, 145-53.
18. Wagner, D. A. & Czajkowski, C. (2001). Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* 21, 67-74.
19. Kotzyba-Hibert, F., Mourot, A., Grutter, T. & Goeldner, M. (2004). Mapping the Acetylcholine Binding Sites of Torpedo Nicotinic Receptor using Photoaffinity Labeling : past, present and future. In *XIth Cholinergic Mechanisms Symposium* (A. Fisher and H. Soreq Eds., M. D. L., ed.), London.

20. Galzi, J. L., Revah, F., Bouet, F., Menez, A., Goeldner, M., Hirth, C. & Changeux, J. P. (1991). Allosteric transitions of the acetylcholine receptor probed at the amino acid level with a photolabile cholinergic ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5051-5.
21. Grutter, T., Bertrand, S., Kotzyba-Hibert, F., Bertrand, D. & Goeldner, M. (2002). Structural reorganization of the acetylcholine binding site of the torpedo nicotinic receptor as revealed by dynamic photoaffinity labeling. *Chembiochem* 3, 652-8.
22. Chatrenet, B., Kotzyba-Hibert, F., Mulle, C., Changeux, J. P., Goeldner, M. P. & Hirth, C. (1992). Photoactivatable agonist of the nicotinic acetylcholine receptor: potential probe to characterize the structural transitions of the acetylcholine binding site in different states of the receptor. *Mol Pharmacol* 41, 1100-6.
23. Waksman, G., Fournie-Zaluski, M. C. & Roques, B. (1976). Synthesis of fluorescent acyl-cholines with agonistic properties: pharmacological activity on Electrophorus electroplaque and interaction in vitro with Torpedo receptor-rich membrane fragments. *FEBS Lett* 67, 335-42.
24. Heidmann, T. & Changeux, J. P. (1979). Fast kinetic studies on the allosteric interactions between acetylcholine receptor and local anesthetic binding sites. *Eur J Biochem* 94, 281-96.
25. Heidmann, T. & Changeux, J. P. (1980). Interaction of a fluorescent agonist with the membrane-bound acetylcholine receptor from Torpedo marmorata in the millisecond time range: resolution of an "intermediate" conformational transition and evidence for positive cooperative effects. *Biochem Biophys Res Commun* 97, 889-96.
26. Heidmann, T., Bernhardt, J., Neumann, E. & Changeux, J. P. (1983). Rapid kinetics of agonist binding and permeability response analyzed in parallel on acetylcholine receptor rich membranes from Torpedo marmorata. *Biochemistry* 22, 5452-9.
27. Martinez, K. L., Corringer, P. J., Edelstein, S. J., Changeux, J. P. & F, M. i. q. m. (2000). Structural differences in the two agonist binding sites of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor revealed by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Biochemistry* 39, 6979-90.
28. Song, X. Z., Andreeva, I. E. & Pedersen, S. E. (2003). Site-selective agonist binding to the nicotinic acetylcholine receptor from Torpedo californica. *Biochemistry* 42, 4197-207.
29. Mourot, A., Kotzyba-Hibert, F., Doris, E. & Goeldner, M. (2002). New and convenient synthesis of a tritiated photo activatable nicotinic agonist: [H-3]-AC5. *Journal of Labelled Compounds & Radiopharmaceuticals* 45, 943-953.
30. Saitoh, T. & Changeux, J. P. (1980). Phosphorylation in vitro of membrane fragments from Torpedo marmorata electric organ. Effect on membrane solubilization by detergents. *Eur J Biochem* 105, 51-62.
31. Neubig, R. R., Krodell, E. K., Boyd, N. D. & Cohen, J. B. (1979). Acetylcholine and local anesthetic binding to Torpedo nicotinic postsynaptic membranes after removal of nonreceptor peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 690-4.
32. Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83, 346-56.
33. Schmidt, J. & Raftery, M. A. (1973). A simple assay for the study of solubilized acetylcholine receptors. *Anal Biochem* 52, 349-54.
34. Langenbuch-Cachat, J., Bon, C., Mulle, C., Goeldner, M., Hirth, C. & Changeux, J. P. (1988). Photoaffinity labeling of the acetylcholine binding sites on the nicotinic receptor by an aryldiazonium derivative. *Biochemistry* 27, 2337-45.
35. Le Novere, N., Grutter, T. & Changeux, J. P. (2002). Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca²⁺-binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3210-5.
36. Marti-Renom, M. A., Stuart, A. C., Fiser, A., Sanchez, R., Melo, F. & Sali, A. (2000). Comparative protein structure modeling of genes and genomes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29, 291-325.
37. Schapira, M., Abagyan, R. & Totrov, M. (2002). Structural model of nicotinic acetylcholine receptor isoforms bound to acetylcholine and nicotine. *BMC Struct Biol* 2, 1.
38. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol* 267, 727-48.
39. Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234, 779-815.
40. Case, D. A., Pearlman, D. A., Caldwell, J. W., Cheatham III, T. E., Wang, J., Ross, W. S., Simmerling, C. L., Darden, T. A., Merz, K. M., Stanton, R. V., Cheng, A. L., Vincent, J. J., Crowley, M., Tsui, V., Gohlke, H., Radmer, R. J., Duan, Y., Pitera, J., Massova, I., Seibel, G. L., Singh, U. C., Weiner, P. K. & Kollman, P. A. (2002). AMBER 7, University of California.
41. Tierney, M. L., Osborn, K. E., Milburn, P. J. & Howitt, S. M. (2004). Submitted (NOV-2003) to the EMBL/GenBank/DBJ databases.

Structure et Dynamique du Récepteur Nicotinique

Le travail de cette thèse a porté sur le récepteur nicotinique (nAChR), une protéine membranaire allostérique qui appartient à la grande famille des récepteurs canaux extracellulaires. Le nAChR intervient dans la transduction d'un signal chimique en signal électrique au niveau de la membrane postsynaptique de la jonction neuromusculaire et de celle de synapses nicotiques centrales. Le neuromédiateur acétylcholine, en se liant au nAChR, provoque l'ouverture du canal et la dépolarisation de la membrane. En présence continue d'agoniste, le récepteur entre ensuite dans un état fermé réfractaire à toute stimulation : on parle de phénomène de désensibilisation.

La connaissance structurale du nAChR a connu ces dernières années un véritable essor, mais la dynamique moléculaire du récepteur est toujours imprécise. Nous avons donc décidé d'étudier la dynamique structurale du nAChR, au cours de la désensibilisation, à l'aide d'une technique développée dans notre laboratoire : le marquage de photoaffinité dynamique. Cette technique repose sur l'incubation, à l'obscurité, d'un agoniste photosensible avec le nAChR, et ceci pendant un temps déterminé à l'aide d'un appareil de mélange rapide. Une photolyse flash permet ensuite de « photographier » le récepteur dans un état conformationnel transitoire.

Nous avons dans un premier temps synthétisé l'agoniste photosensible et radiomarké [^3H]AC5 et établi sa caractérisation pharmacologique. Les profils d'incorporation de cette sonde se sont révélés être intimement liés à l'état conformationnel du nAChR. La construction d'un modèle moléculaire, basé sur la structure d'une protéine soluble homologue au nAChR, nous a permis d'entrevoir les réorganisations structurales qui s'opèrent au cours de la désensibilisation du nAChR. Nous proposons un modèle de réarrangement quaternaire dans lequel les sous-unités du nAChR subiraient une rotation concertée, en accord avec la théorie de l'allostérie selon Monod-Wyman-Changeux.

Structure and Dynamics of the Nicotinic Receptor

The focus of this thesis is the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), a transmembrane allosteric protein that belongs to the Ligand Gated Ion Channel (LGIC) family. This receptor is located at the postsynaptic membrane of the neuromuscular junction and the neuronal synapse; it converts a chemical signal into an electrical one. Upon binding, the neurotransmitter acetylcholine leads to ion channel gating and to the depolarization of the membrane. Continuous exposure to its agonist drives the nAChR to a closed state: this molecular phenomenon is called desensitization.

In the last couple of years considerable progress has been made in the understanding of the nAChR structure, however the dynamics of the receptor is still elusive. We thus sought to study, at the molecular level, the allosteric transitions governing the regulation of the nicotinic receptor. This can be achieved using a technique developed in our laboratory: dynamic photolabelling with photoactivatable cholinergic agonists. Dynamic photoaffinity labeling combines the power of photochemical covalent bond formation with rapid mixing techniques. A stopped-flow mixing device adapted with a photochemical quenching system was used to analyze the structural reorganization at the ACh binding site.

We first synthesized the photosensitive radiolabeled nicotinic agonist [^3H]AC5. This molecule was then tested for its pharmacological properties. The photoincorporation of this probe is highly dependent on nAChR conformational state. A molecular model of the ligand binding domain, based on the atomic structure of a soluble homologous protein, allowed us to propose a model for the allosteric transition governing the nAChR during desensitization. This study suggests a concerted rotation of all five subunits of the nAChR, in agreement with the Monod-Wyman-Changeux theory of allosteric transitions.