THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université Paris Descartes
École Doctorale Médicament, Toxicologie, Chimie, Environnement

Modulateurs allostériques des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B : sites de liaison et mécanismes d'action

Présentée par : Laetitia Mony

Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques
CNRS UMR 8601
Université Paris Descartes
45 rue des Saints Pères, 75006 Paris

Institut de Biologie de l'ENS
Section Neurosciences
CNRS UMR 8197, INSERM U1024
École Normale Supérieure
46 rue d'Ulm, 75005 Paris

Soutenue le 2 juillet 2010 devant le jury composé de :

Pr. Christiane Garbay	Présidente du jury
Dr. Thomas Grutter	Rapporteur
Dr. Jean-Philippe Pin	Rapporteur
Dr. James Kew	Examinateur
Dr. Francine Acher	Directrice de Thèse
Dr. Pierre Paoletti	Directeur de Thèse

Table des matières

Résumé **11**

Summary **13**

Remerciements **15**

Avant Propos **17**

I Introduction **19**

1 Les récepteurs du glutamate **21**
1.1 Les récepteurs métabotropiques du glutamate 23
1.2 Les récepteurs ionotropiques du glutamate 26
1.2.1 Diversité moléculaire et rôles physiologiques des iGluRs 27
1.2.2 Architecture moléculaire des iGluRs 40
1.3 Mécanismes d'activation des récepteurs ionotropiques du glutamate 51
1.3.1 Activation, désactivation et désensibilisation des iGluRs 51
1.3.2 Le rôle des domaines N-terminaux dans le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA 57

2 La famille des protéines apparentées à LIVBP : repliement, mode de fonctionnement et assemblage multimérique **63**
2.1 Dynamique structurale des domaines isolés de la famille LIVBP 67
2.1.1 Les protéines de la famille LIVBP adoptent deux états conformationnels 67
2.1.2 Bases moléculaires de l'affinité et de la sélectivité pour les ligands . 71
2.2 Assemblage et mécanismes d'activation des récepteurs comportant des domaines de type LIVBP 76
2.2.1 Les domaines de type LIVBP s'assemblent en dimères 76
2.2.2 Bases moléculaires de l'activation des mGluRs 79
2.2.3 Quand le ligand ne se fixe pas dans la crevasse interlobaire : exemple des récepteurs aux peptides natriurétiques 84

2.3 Structure et assemblage des domaines N-terminaux des récepteurs ionotropiques du glutamate . . . 86
2.3.1 Les domaines N-terminaux des récepteurs AMPA et kainate . . . 87
2.3.2 Structure du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA : un domaine LIVBP "tordu" . . . 96

3 Modulation allostérique des récepteurs NMDA 101
3.1 Inhibition par les protons . . . 103
3.2 Les modulateurs se liant dans la région N-terminale des récepteurs NMDA . 107
3.2.1 Inhibition par le zinc des récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B . . . 108
3.2.2 L'ifenprodil, un composé organique ciblant sélectivement la sous-unité GluN2B . . . 112
3.2.3 Mécanisme d'action des composés se liant dans le NTD des récepteurs NMDA . . . 115
3.3 Modulation allostérique positive par les polyamines . . . 116
3.3.1 L'inhibition dépendante du potentiel transmembranaire . . . 119
3.3.2 La potentialisation dépendante de la glycine . . . 119
3.3.3 La potentialisation indépendante de la glycine et indépendante du potentiel transmembranaire . . . 120
3.3.4 Pertinence physiologique de la potentialisation des récepteurs NMDA par les polyamines . . . 122
3.4 Les neurostéroïdes : des modulateurs positifs et négatifs . . . 124

4 Les récepteurs NMDA, une cible d'intérêt thérapeutique 129
4.1 Récepteurs NMDA et excitotoxicité . . . 130
4.2 Potentiel thérapeutique des antagonistes des récepteurs NMDA . . . 133
4.2.1 L'échec des antagonistes de première génération : antagonistes compétitifs et des bloqueurs du canal ionique . . . 135
4.2.2 Le potentiel des antagonistes de seconde génération : antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B . . . 138
4.3 Rôles physiopathologiques émergents des récepteurs NMDA . . . 143
4.3.1 Hypofonction des récepteurs NMDA et schizophrénie . . . 143
4.3.2 Sous-unité NR3A, oligodendrocytes et gaine de myéline . . . 144

Conclusion 147

II Résultats 149

5 Étude des déterminants moléculaires à l'origine de la liaison de l'ifenprodil dans le domaine N-terminal de GluN2B 151
5.1 Contexte de l'étude . . . 151
5.2 Article I . . . 157

5.3 Article II . . . 165
5.4 Commentaires . . . 191
5.4.1 Le marquage d'affinité sur cystéines utilisant des dérivés d'ifenprodil thio-réactifs : une approche à succès mitigé . . . 191
5.4.2 Comparaison de notre modèle par homologie avec la structure cristallographique du NTD de GluN2B . . . 195
5.4.3 Pourquoi l'ifenprodil n'inhibe-t-il pas les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A ? . . . 204

6 Identification par criblage virtuel de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA 215
6.1 Contexte . . . 215
6.1.1 La technique du criblage virtuel . . . 216
6.1.2 Mise au point d'un criblage virtuel sur la base d'un modèle de pharmacophore . . . 219
6.1.3 Article III . . . 229
6.2 Discussion . . . 244
6.2.1 Génération et validation d'un modèle de pharmacophore en vue d'un criblage virtuel . . . 246
6.2.2 LSP10-0500, LSP10-0502 et LSP10-0504, des composés originaux ... mais à optimiser . . . 248

7 Binding site and mechanism of positive allosteric modulators on NMDA receptors 253
7.1 Introduction . . . 253
7.2 Article IV . . . 259
7.2.1 Methods . . . 261
7.2.2 Results . . . 263
7.2.3 Supplementary figures . . . 285
7.2.4 Directly probing polyamine binding-site by the mean of photoreactive spermine compounds . . . 291
7.3 Discussion . . . 299
7.3.1 Polyamines bind at the interface between NR1 and NR2B subunits . 299
7.3.2 NR1 and NR2B NTDs are likely to form heterodimers . . . 302
7.3.3 Mechanism of positive allosteric modulation of NMDARs and modulatory role of NMDAR NTDs . . . 304
7.3.4 Does NR1 NTD undergo conformational changes during the transition between the active and "desensitised" states? . . . 307
7.3.5 The exon 5: an intrinsic positive modulator acting at polyamine potentiating site? . . . 309
7.3.6 The different strategies of positive allosteric modulation in iGluRs . 315

Conclusion générale 319

III Annexes **323**
7.4 Abbréviations 325
7.5 Couleurs conventionnelles de représentation des atomes d'une molécule organique ou d'une protéine 326
7.6 Légende de l'alignement supplémentaire 327
7.7 Article V 329
7.8 Revue 349

Bibliographie **369**

Table des figures

1.1 La synapse glutamatergique 22
1.2 Les récepteurs métabotropiques du glutamate 25
1.3 Les différentes classes de la famille des iGluRs 27
1.4 Propriétés cinétiques des récepteurs AMPA et NMDA 28
1.5 Distribution des différentes sous-unités des récepteurs NMDA au cours du développement 35
1.6 Distribution des différentes sous-unités des récepteurs NMDA chez l'adulte 36
1.7 Architecture moléculaire des iGluRs 41
1.8 Structure du pore des iGluRs 45
1.9 Structure tétramérique d'un récepteur AMPA entier 46
1.10 Non équivalence des sous-unités au sein du tétramère AMPA 47
1.11 Hypothèses d'arrangements relatifs des sous-unités des récepteurs NMDA . 50
1.12 Mécanisme d'activation des iGluRs 53
1.13 Les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA 57
1.14 Le rôle du NTD dans la modulation de l'activité des récepteurs NMDA . . 58

2.1 Structure tridimensionnelle de LIVBP 64
2.2 Les grandes familles de récepteurs comportant des domaines LIVBP 66
2.3 Les différentes conformations de LIVBP et du VFD de $mGlu_1$ 71
2.4 Modes de liaison des acides aminés chez LIVBP et $mGlu_1$ 73
2.5 Conservation des résidus pour les domaines LIVBP des mGluRs 78
2.6 L'assemblage en dimères des VFDs de $mGlu_1$ 80
2.7 Mécanismes d'activation des mGluRs 82
2.8 Structures de la partie extracellulaire de NPR-C 85
2.9 Comparaison des structures des NTDs des iGluRs avec le VFD de $mGlu_1$. 88
2.10 Conservation des résidus chez les récepteurs AMPA et kainate 91
2.11 Comparaison des interfaces de dimérisation entre les NTDs de GluK2 et $mGlu_1$ 92
2.12 Hydrophobicité et potentiel électrostatique à la surface des NTDs de iGluRs 93
2.13 Les NTDs des récepteurs AMPA et kainate adoptent un degré d'ouverture "intermédiaire" 94
2.14 Structure du NTD de la sous-unité GluN2B 97

3.1 Les modulateurs allostériques des récepteurs NMDA 102
3.2 L'hélice TM2 du pore, un site de modulation par les protons ? 105
3.3 Inhibition par le zinc des différents sous-types de récepteurs NMDA 109
3.4 Structure du site de liaison du zinc dans le NTD de GluN2B 111
3.5 Le NTD de la sous-unité GluN2B contrôle la sensibilité des récepteurs NMDA à l'ifenprodil 114
3.6 Métabolisme des polyamines 118
3.7 Effets inhibiteur et potentialisateur des polyamines 118
3.8 3α5βS inhibe les récepteurs NMDA de façon indépendante du potentiel membranaire 127

4.1 Sites de modulation négative des récepteurs NMDA 133
4.2 Exemples de bloqueurs du canal ionique des récepteurs NMDA 136
4.3 Exemples d'antagonistes compétitifs des récepteurs NMDA 137
4.4 Exemples d'antagonistes spécifiques de la sous-unité GluN2B 140

5.1 Comparaison des résidus contrôlant les sensibilités à l'ifenprodil et au zinc des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B 155
5.2 Principe du marquage d'affinité sur cystéines 156
5.3 Effet irréversible de l'ifenprodil à haute concentration 193
5.4 Superposition du modèle par homologie publié dans Mony et al. (2009b) et de la structure cristallographique du NTD de GluN2B 197
5.5 Etude détaillée des différences entre le modèle par homologie et la structure cristallographique du NTD de GluN2B 201
5.6 Localisation des résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B 202
5.7 Régions divergentes des NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B 205
5.8 localisations des régions divergentes entre les NTDs de GluN2A et GluN2B 206
5.9 Les dérivés de l'ifenprodil n'inhibent pas les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A à pH acide 209
5.10 GluN1-D130, un résidu pointant dans la crevasse interlobaire du NTD de GluN2B ? 212

6.1 Pharmacophores relatifs aux antagonistes spécifiques de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA 221
6.2 Exemples d'ajustement de deux molécules du "training set" sur le modèle de pharmacophore sélectionné 224
6.3 Les différentes catégories de molécules au sein d'un "dataset" 225
6.4 Principe des courbes ROC 227
6.5 Training set 233
6.6 Pharmacophore model of NR2B-specific, "ifenprodil-like", NMDAR antagonists 234
6.7 ROC curve analysis of the pharmacophore model of NR2B-specific NMDAR antagonists 235

6.8 Summary of the virtual screening workflow . . . 236
6.9 Dose-reponse curve of LSP10-0500 . . . 237
6.10 Structures chimiques des hits LSP10-0500, LSP10-0502 et LSP10-0504 . . . 248
6.11 Modes de liaison supposés des hits LSP10-0500, LSP10-0502 et LSP10-0504 dans le NTD de GluN2B . . . 249

7.1 Different hypothesis for the mechanism of potentiation by polyamines . . . 255
7.2 Properties of the glycine-independent and voltage-independent spermine potentiation . . . 264
7.3 The NTD of both NR1 and NR2B subunits controls spermine sensitivity of NMDARs . . . 267
7.4 The β6–β8 region in the lobe II of NR2B NTD is critical for spermine potentiation . . . 271
7.5 NR1 and NR2B NTDs assemble as heterodimers . . . 275
7.6 Introduction of positive charges in NR1/NR2B lobe 2 dimer interface mimics the effect of spermine . . . 280
7.7 Spermine stabilises an open-cleft conformation of NR2B NTD . . . 282
7.8 Proposed mechanism of the positive allosteric modulation of NR2B-containing NMDARs by polyamines . . . 284
7.9 sequence alignment of iGluR subunits . . . 285
7.10 Electrostatic potential surfaces of the homology models of NR1, NR2B and NR2A NTDs . . . 286
7.11 Amplitudes of spermine-induced potentiations on different cysteine and alanine mutants . . . 287
7.12 Comparison of the pH IC_{50} and relative τ_{on}MK801 of NMDA receptors incorporating NR1wt and different NR2A/NR2B chimeric subunits . . . 288
7.13 Amplitudes of spermine-induced potentiations on different arginine and lysine mutants . . . 289
7.14 Comparison of the relative τ_{on}MK801 of different NR1/NR2B arginine and lysine mutants . . . 290
7.15 Preliminary results of photolabelling with a photoreactive spermine derivative 292
7.16 Tri-functional spermine derivatives . . . 296
7.17 Effect of the deletion of NR1 NTD on the open probability of NR1/NR2B receptors . . . 308
7.18 Modification by MTS of cysteines introduced in its putative interlobe cleft have no effect on NMDAR activity . . . 310
7.19 Predicted structure of the NTD of NR1 splice variant NR1-1b . . . 311
7.20 NR2B NTD controls exon 5-induced decresase in pH sensitivity of NMDARs 313
7.21 Exon 5 insertion strongly reduces spermine sensitivity . . . 314
7.22 The different strategies of positive allosteric modulation among iGluRs . . . 317

Résumé

Les récepteurs NMDA (rNMDA) forment une classe de récepteurs-canaux membranaires activés par le glutamate, le principal neurotransmetteur excitateur du cerveau des Vertébrés. Ils jouent un rôle prépondérant dans l'initiation de différentes formes de plasticité synaptique mais sont également impliqués dans diverses pathologies comme les ischémies cérébrales, les douleurs chroniques ou la schizophrénie. Les composés régulant l'activité des rNMDA ont donc un fort intérêt thérapeutique. De façon remarquable, les rNMDA possèdent de nombreux sites modulateurs extracellulaires pouvant lier des ions ou des petites molécules. Ces sites allostériques, qui diffèrent des sites de liaison pour les agonistes et de ceux situés dans le canal, sont d'autant plus intéressants qu'ils permettent de cibler sélectivement certains sous-types de rNMDA, ce que les autres sites ne permettent généralement pas. Ainsi, l'ifenprodil (modulateur négatif synthétique) et les polyamines (modulateurs positifs présents naturellement) sont des composés agissant sélectivement sur les rNMDA contenant la sous-unité GluN2B. Les sites de liaison et les mécanismes d'action de ces composés restaient cependant mal connus.

En combinant modélisation moléculaire, électrophysiologie, mutagénèse dirigée et biochimie sur cystéines, nous avons tout d'abord établi un modèle tridimensionnel d'interactions de l'ifenprodil avec le domaine N-terminal (NTD) de la sous-unité GluN2B. Nous avons de plus identifié l'interface de dimérisation entre les NTDs des sous-unités GluN1 et GluN2B comme le site de fixation des polyamines, et proposons que ces molécules potentialisent les rNMDA en maintenant proches les deux NTDs, empêchant ainsi leur fermeture.

Ces travaux apportent de nouvelles informations sur les bases moléculaires qui régissent la régulation allostérique des rNMDA. Ils soulignent notamment le rôle central des NTDs dans le contrôle fin de l'activité des rNMDA et révèlent l'importance des interfaces entre sous-unités comme sites d'action de ligands allostériques.

Summary

NMDA receptors (NMDARs) are a major class of excitatory neurotransmitter receptors in the brain of Vertebrates. They form glutamate-gated ion channels highly permeable to calcium that mediate synaptic plasticity. NMDAR dysfunction is involved in multiple brain disorders, including stroke, chronic pain and shizophrenia. Compounds that regulate NMDAR activity are thus of therapeutic interest. Remarkably, NMDARs are endowed with multiple extracellular regulatory sites that recognise ions or small molecule ligands. These allosteric sites, which are distinct from agonist-binding and channel-permeation sites, are of particular interest because they can selectively target certain NMDAR subtypes. Thus, ifenprodil (a synthetic allosteric modulator) and polyamines (naturally occuring positive allosteric modulators) selectively modulate GluN2B-containing NMDARs. However, the binding sites and mechanisms of action of these compounds were still ill-defined.

By combining molecular modelling, electrophysiology, site-directed mutagenesis and chemical protein modifications, we first built a tridimensional model of ifenprodil interacting with the N-terminal domain (NTD) of the GluN2B subunit. Moreover, we have identified the dimerisation interface between GluN1 and GluN2B NTDs as polyamine binding-site. We propose that these molecules potentiate NMDARs by maintaining both NTDs in close proximity, thus preventing their closure.

This work reveals new information about the molecular mechanisms underlying allosteric regulation of NMDARs. They highlight the central role of NTDs in the fine control of NMDAR activity and show the importance of interfaces between subunits as binding sites for allosteric ligands.

Remerciements

J'aurais dit, paraît-il, que je n'aime pas les gens. Dans ce cas, pourquoi faire des remerciements ? Je vais quand même en faire, tout d'abord parce que c'est la seule page de ma thèse que certains liront, et puis parce qu'il y a certaines personnes que j'aime bien malgré tout.

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail : Thomas Grutter et Jean-Philippe Pin, rapporteurs de ma thèse ; James Kew, examinateur et Christiane Garbay, qui a accepté d'être présidente du jury. Je salue au passage le courage de James Kew qui a accepté d'évaluer une thèse majoritairement écrite et présentée en français.

Je souhaite ensuite remercier mes deux directeurs de thèse, Francine et Pierre. Merci pour votre dynamisme, votre efficacité et votre disponibilité. J'estime avoir eu beaucoup de chance de vous avoir eu comme directeurs de thèse. Francine, j'aime votre enthousiasme et vos questions toujours pertinentes. Pierre, malgré des débuts difficiles, j'espère t'avoir montré que j'étais quelqu'un digne de confiance. J'aimerais aussi remercier énormément Jacques, pour ses qualités scientifiques et humaines exceptionnelles.

Merci à Hugues-Olivier Bertrand et à Nicolas Triballeau pour m'avoir initié à la modélisation moléculaire.

Je tiens également à remercier les personnes avec qui j'ai collaboré : les membres du Laboratoire de chimie Bioorganique à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg, ainsi que ceux du laboratoire de Chimie et Photonique Moléculaires, en particulier Mathieu Pucheault, ami et collaborateur qui conçoit les molécules dont on n'oserait rêver.

Merci à l'équipe des Saints Pères, à Delphine, Isabelle Lemasson, Isabelle McCort, Sara, Tiphanie, Nicolas, aux "petits jeunes" Franck et Lilian et aussi à Xavier et Guillaume. Non, je vous assure, je ne pratique pas le "lap dance". D'ailleurs je trouve que vous avez un peu l'esprit tordu ! Merci aussi à tous les membres de l'UMR8601, et particulièrement à mes collègues de P1.

Merci aussi au laboratoire de Neurobiologie. En premier lieu, merci aux membres de l'équipe "récepteurs du glutamate". Anne Le Goff, tu as toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles. Angela, merci aussi pour ton soutien, ton exubérance et tes fautes de français. Steph, merci d'être toi-même. Merci pour vos pauses clopes, qui me donnent une excuse pour prendre l'air. Marc, merci d'être drôle, surtout quand tu ne fais pas de blagues. David, merci d'avoir augmenté ma culture générale en me parlant du dernier film traitant de la traite des femmes afghanes entre 1975 et 1982. Bienvenue aux nouvelles recrues Morgane, Shujia et Shixin. Enfin merci à Clarisse, ma première étudiante,

qui partage avec moi l'horreur des fautes d'orthographe.

Enfin, merci aux autres membres du laboratoire. Dans le désordre, et sans respecter aucune hiérarchie, je citerai Charly, Céline, Héloïse, France, Camille, Antonin, Rémi, Daniela, Romain, Clément, Guillaume, Boris, German, Annick, Mariano, Anne Feltz, Camilla, Alexei, Steph Sup, Karin, Lu, Peng, Steph Dieu, Eric, Marco, Julien, Juliette, Adela, Laurent, Jean-François, Sreng, Hong-Ying, Gérard, Denise, ainsi que nos super gestionnaires Solange, Eric, Diane et Aurore. C'est toujours un plaisir de discuter avec vous dans le couloir, devant une bière chez Youcef, à la cantine ou en screenant des ovocytes. Désolée pour les victimes de mes piques d'ironie, de toute façon certaines personnes me le rendent bien (hein, Antonin et Rémi ?). Un petit coucou aux membres du troisième étage, dont Thomas, Marie et Géraldine.

"Un esprit sain dans un corps sain" pourrait être ma devise. Je salue les membres du club athlé de l'ENS et l'entraîneur Richard pour leur convivialité et leur bonne humeur sans faille, ainsi que pour leurs talents de cuisiniers ! Je vous regretterai quand je quitterai l'ENS car je ne suis pas sure de retrouver un club aussi sympa.

Enfin, un grand merci à tous mes proches. Merci à mes parents pour m'avoir inculqué le goût des sciences. Merci à Isabelle et Johanna. Merci à Matthieu qui, chevauchant sa kangoo, a réveillé la princesse qui sommeillait en moi. Tu m'as (entre autres choses) grandement aidé au moment de la rédaction de ma thèse, que ce soit en résolvant les problèmes de LaTex, ou en assurant toute la logistique de la maison. Et tu ne t'es jamais plaint, contrairement à certaines mauvaises langues qui prédisaient le contraire. À ce sujet, merci à World of Warcraft d'avoir occupé mon chéri pendant les longues soirées de rédaction.

Et merci à toi, lecteur de cette thèse.

Avant-propos

Cette thèse a été effectuée dans le Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques à l'Université Paris Descartes, sous la direction de Francine Acher, ainsi qu'à l'Institut de Biologie de l'École Normale Supérieure, sous la direction de Pierre Paoletti.

Elle porte sur l'étude des sites de liaison et des mécanismes d'action de deux classes de modulateurs allostériques modifiant sélectivement l'activité des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. La première est la classe des dérivés de l'ifenprodil, des molécules de synthèse inhibant les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Ces molécules présentent un intérêt thérapeutique important car elles ont une action neuroprotectrice *in vivo*. La seconde classe est celle des polyamines, l'une des rares classes de modulateurs allostériques à potentialiser l'activité des récepteurs NMDA.

Le manuscrit est divisé en deux grandes parties. La première est une introduction générale sur les récepteurs NMDA, plus particulièrement axée sur la richesse pharmacologique de ces récepteurs par rapport aux autres classes de récepteurs ionotropiques du glutamate (AMPA et kainate), ainsi que sur leur importance physiologique et pathologique. Les caractéristiques des principales classes de récepteurs ionotropiques du glutamate y sont tout d'abord décrites. Nous détaillons ensuite l'organisation structurale des ces récepteurs à la lumière de la structure cristallographique récemment publiée d'un récepteur AMPA entier, ainsi que leurs mécanismes d'activation. Le deuxième chapitre de l'introduction aborde les propriétés communes des protéines de la famille LIVBP, famille à laquelle

appartiennent les domaines N-terminaux des récepteurs ionotropiques du glutamate. Le domaine N-terminal des récepteurs NMDA joue en effet un rôle important dans la modulation allostérique de ces récepteurs. Nous décrivons ensuite les différents modulateurs allostériques des récepteurs NMDA. Enfin, le dernier chapitre de l'introduction traite de l'implication des récepteurs NMDA dans certaines pathologies du système nerveux central et passe en revue les différentes stratégies pharmacologiques utilisée pour contrer l'effet délétère d'une activation aberrante de ces récepteurs.

La deuxième partie du manuscrit porte sur les résultats obtenus au cours de ma thèse. Elle comporte un premier volet qui traite de l'étude tridimensionnelle du site de liaison de l'ifenprodil. Deux articles publiés y sont insérés. Dans la continuité de ce travail, nous avons identifié, par criblage virtuel, de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA sélectifs de la sous-unité GluN2B. Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article de type "lettre", qui n'a pas encore été publié. Enfin, dans le dernier chapitre, nous étudions le mode de liaison et le mécanisme d'action des polyamines, molécules qui potentialisent l'activité des récepteurs NMDA. Ce chapitre est entièrement en anglais, et la partie "résultats" est présentée sous forme d'une première version d'article, qui n'a pas encore été raffinée. Les résultats concernant ce dernier chapitre ne sont pas publiés non plus.

Enfin, en annexe sont insérés deux travaux auxquels j'ai participé. Le premier est un article qui a montré le rôle important du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2 dans le contrôle des différences de probabilité d'ouverture entre différents sous-types de récepteurs NMDA. Le deuxième est une revue qui traite des mécanismes d'action et du potentiel thérapeutique des modulateurs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B.

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Les récepteurs du glutamate

La plupart des neurones du système nerveux central (SNC) communiquent entre eux en libérant des messagers chimiques, les neurotransmetteurs. Actuellement, on connaît plus d'une centaine de neurotransmetteurs différant par leur nature chimique, le type de récepteurs qu'ils activent et l'action post-synaptique qu'ils exercent (inhibition ou excitation). Le premier neurotransmetteur à avoir été identifié est l'acétylcholine (ACh). L'ACh, un neurotransmetteur excitateur, a été beaucoup étudié pour son rôle dans la transmission synaptique à la jonction neuro-musculaire, mais il intervient aussi dans le système nerveux central. Depuis, un nombre considérable de neurotransmetteurs excitateurs a été découvert. On peut ainsi citer, en plus de l'acétylcholine, le glutamate, les neuropeptides et les monoamines (sérotonine, histamine, adrénaline, noradrénaline et dopamine). Par contre le nombre de neurotransmetteurs inhibiteur est limité, presque toutes les synapses inhibitrices du cerveau et de la moëlle épinière utilisant le GABA (acide γ-aminobutyrique) ou la glycine.

Parmi cette multitude de messagers chimiques, le glutamate est le neurotransmetteur excitateur principal du système nerveux central des Vertébrés. On estime que sur les environ 10^{14} synapses que comporte un cerveau humain, plus de la moitié sont glutamatergiques. Le glutamate libéré dans le milieu extracellulaire agit sur deux grandes classes de récepteurs (Figure 1.1) :

– les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs), couplés à une protéine G ;

– les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs), contenant un canal ionique laissant passer les cations Na^+ et K^+, et dans certains cas les ions calcium Ca^{2+}.

Le glutamate diffusant dans la fente synaptique est recapturé par des transporteurs plasmiques de la famille EAAT (pour "excitatory amino-acid transporters") situés au niveau des cellules gliales, ainsi qu'au niveau des régions pré et postsynaptiques (FIGURE 1.1). Cette recapture joue un rôle physiologique important car des niveaux trop élevés de glutamate dans le milieu extracellulaire peuvent induire une toxicité neuronale.

Les iGluRs sont les récepteurs responsables de la transmission synaptique rapide. Leur ouverture entraîne essentiellement une entrée d'ions Na^+, ce qui provoque la dépolarisation de la membrane postsynaptique et l'initiation de potentiels d'action. Les mGluRs, par contre, ont des cinétiques d'activation beaucoup plus lentes et jouent plutôt un rôle de modulateurs de la transmission synaptique.

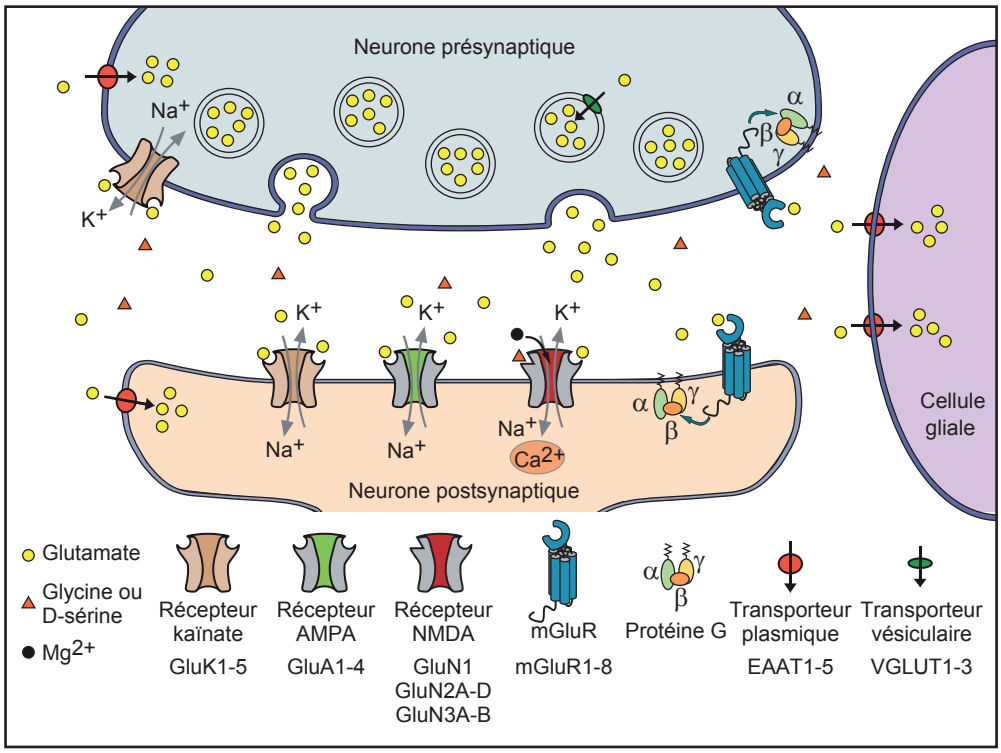


FIGURE 1.1 – Représentation d'une synapse glutamatergique. D'après l'article de Gielen (2010).

1.1 Les récepteurs métabotropiques du glutamate

Les récepteurs métabotropiques du glutamate font partie de la famille 3 des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG), qui contient aussi les récepteurs au GABA (récepteurs $GABA_B$), le senseur calcique, ainsi que certains récepteurs du goût et certains récepteurs aux phéromones (Pin et al., 2003). Ils sont divisés en trois groupes selon leur homologie de séquence, le type de protéine G activée et leur pharmacologie (FIGURE 1.2A). Le groupe I comprend les récepteurs $mGlu_1$ et $mGlu_5$. Ils sont couplés à la protéine G_q qui active la phospholipase C (PLC), ce qui entraîne une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'activation de la protéine kinase C (PKC). Le groupe II des mGluRs comprend les récepteurs $mGlu_2$ et $mGlu_3$ et le groupe III les récepteurs $mGlu_4$, $mGlu_6$, $mGlu_7$ et $mGlu_8$. Les mGluRs des groupes II et III sont couplés à la protéine $G_{i/o}$ qui inhibe l'adényl cyclase et certains types de canaux calciques (Pin et al., 2003; Niswender and Conn, 2010). La fonction et la localisation des différents groupes de mGluRs varie en fonction de la région du cerveau et du type cellulaire considérés. Cependant, on peut dire que les mGluRs du groupe I sont majoritairement exprimés de façon postsynaptique. Ils induisent une dépolarisation et une augmentation de l'excitabilité de la cellule postsynaptique via la modulation d'un certain nombre de canaux ioniques, dont les récepteurs AMPA et NMDA (voir section suivante). Il a en effet été montré que la phosphorylation des récepteurs NMDA et des récepteurs AMPA par la PKC augmente la probabilité d'ouverture de ces derniers (Dingledine et al., 1999). Cependant des mGluRs du groupe I présynaptiques ont aussi été mis en évidence. L'activation de ces derniers induit une augmentation de la libération de neurotransmetteur (Pinheiro and Mulle, 2008). Les mGluRs des groupes II et III sont plutôt présynaptiques et inhibent la libération de neurotransmetteur. Les mGluRs du groupe II sont présents à la fois dans les synapses glutamatergiques et GABAergiques. Il a aussi été montré que les récepteurs $mGlu_3$ sont présents sur les cellules gliales, où ils ont un rôle neuroprotecteur (Corti et al., 2007). Parmi les mGluRs du groupe III, les récepteurs $mGlu_4$ sont une cible thérapeutique prometteuse pour le traitement de

la maladie de Parkinson (Niswender and Conn, 2010). En effet, l'activation des récepteurs $mGlu_4$ diminue la libération de GABA à la synapse striato-pallidale, une synapse qui est sur-activée chez les patients atteints de la maladie de Parkinson. L'administration de LSP1-2111, un agoniste sélectif de $mGlu_4$, à des modèles de rats parkinsonniens réduit les symptômes de cette maladie (Beurrier et al., 2009).

Les mGluRs forment des homodimères. Les sous-unités des mGluRs partagent une structure modulaire commune composée d'une extrémité C-terminale, d'un domaine transmembranaire et d'une importante région extracellulaire N-terminale (voir Pin et al., 2003 et FIGURE 1.2B). L'extrémité C-terminale est la partie la plus divergente entre les différents mGluRs. Elle est impliquée dans l'interaction des récepteurs avec des protéines intracellulaires. Comme toutes les protéines de la superfamille des RCPG, les mGluRs comportent un domaine transmembranaire composé de sept hélices α. Le domaine transmembranaire interagit avec la protéine G par le biais de ses boucles intracellulaires. Ce domaine constitue en outre le site de liaison des modulateurs allostériques, positifs ou négatifs, des mGluRs (Conn et al., 2009). La région extracellulaire, quant à elle, est composée de deux domaines dont la structure cristallographique est connue (FIGURE 1.2C ; Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002; Muto et al., 2007). Le premier est un domaine globulaire composé de deux lobes reliés par une charnière et apparenté à la protéine périplasmique bactérienne "leucine/isoleucine/valine-binding protein" (LIVBP ; O'Hara et al., 1993). Ce domaine contient le site de liaison du glutamate, qui se lie dans l'espace interlobaire (la structure du domaine N-terminal des mGluRs sera détaillée dans le chapitre suivant). Pour cette raison, ce domaine a été nommé domaine "Venus flytrap" (VFD) par analogie avec la Dionée, une plante carnivore composée de deux lobes se refermant sur leur proie. L'existence du VFD est spécifique aux RCPG de la classe 3, et nous verrons que ce domaine partage aussi une homologie de séquence avec les domaines N-terminaux des récepteurs ionotropiques du glutamate (Section 1.2.2). Le second domaine est appelé domaine riche en cystéines. Sa structure cristallographique (Muto et al., 2007) nous indique qu'il est

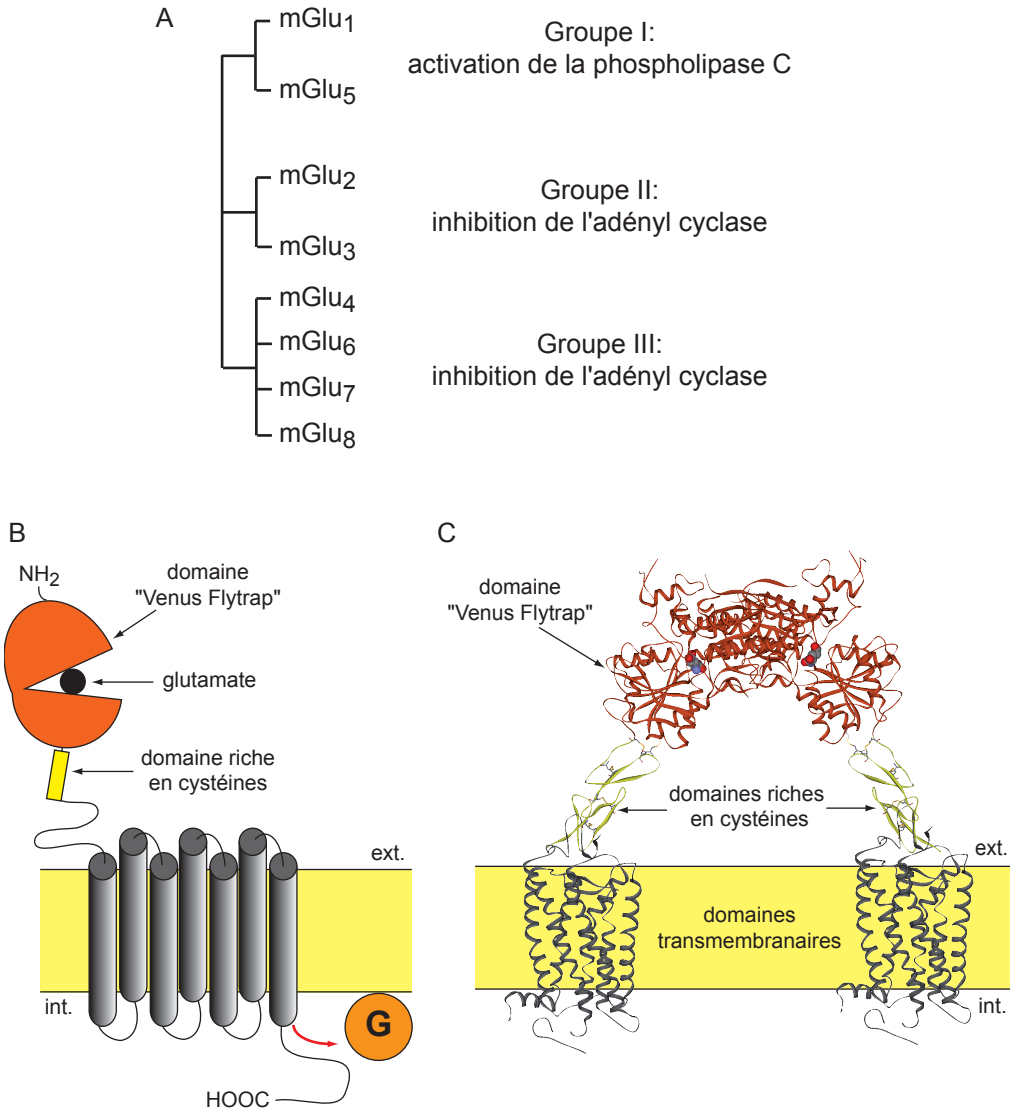


FIGURE 1.2 – Les récepteurs métabotropiques du glutamate. A, Différents groupes de mGluRs. B, Représentation schématique d'une sous-unité de mGluR. C, Représentation d'un dimère de mGluR en conformation inactive "fermé-fermé/R" (voir Section 2.2.2) à partir de la structure cristallographique d'un dimère de domaines extracellulaires de $mGlu_3$ (domaine "Venus flytrap" et domaine riche en cystéines, pdb : 2e4u). Les cystéines du domaine riche en cystéines sont représentées sous forme de bâtonnets, le glutamate dans les VFD est représenté sous forme CPK, avec les codes couleur conventionnels (voir Annexe). La partie transmembranaire est représentée par la structure cristallographique de la rhodopsine (pdb : 1f88).

constitué de six feuillets β maintenus ensemble par quatre ponts disulfure et qu'il est aussi relié au VFD par un pont disulfure. Ce domaine est impliqué dans la transduction vers les segments transmembranaires du signal induit par la liaison du glutamate dans le VFD. L'obtention de structures cristallographiques de dimères de VFD dans différentes conformations a donné des éléments de réponse concernant le mécanisme d'activation des mGluRs (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002; Pin et al., 2005). Ce mécanisme sera détaillé dans le chapitre suivant, Section 2.2.2. En résumé, la liaison du glutamate dans les VFD induit un rapprochement des lobes inférieurs des VFD, ce qui se traduit par un rapprochement des deux domaines transmembranaires (voir FIGURE 2.6). C'est ce rapprochement des domaines transmembranaires qui induirait l'activation de la protéine G.

1.2 Les récepteurs ionotropiques du glutamate

La famille des récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluRs) a été initialement divisée en trois classes, selon la nature des agonistes activant sélectivement chacune de ces classes (Watkins and Jane, 2006). On distingue ainsi les récepteurs AMPA, sélectivement activés par l'acide (S)-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionique (AMPA) ; les récepteurs kainate, sélectivement activés par l'acide kaïnique, issu de l'algue marine *Digenia simplex* ; et les récepteurs NMDA, activés sélectivement par l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA) (FIGURE 1.3). Le clonage des sous-unités formant les iGluRs, initié en 1989 par Hollmann et al. (1989), a mis en évidence que l'hétérogéinéité pharmacologique existant au sein des différentes classes d'iGluRs était accompagnée d'une hétérogénéité moléculaire. En effet, si les sous-unités au sein d'une même classe de récepteurs partagent une forte identité de séquence (sauf pour les récepteurs NMDA), l'identité de séquence entre classes différentes est nettement plus faible. Par exemple, les sous-unités des récepteurs AMPA partagent 54 % d'identité de séquence, celles des récepteurs kainate en partagent 29 %. L'ensemble des sous-unités AMPA + kainate ne partage par contre que

17 % d'identité. Une nouvelle classe d'iGluRs a été mise en évidence à partir de sa similarité de séquence avec les autres classes d'iGluRs (Yamazaki et al., 1992). Les récepteurs de cette nouvelle classe, les récepteurs δ, ne forment pas de canaux fonctionnels et leur mode d'action est encore mal défini.

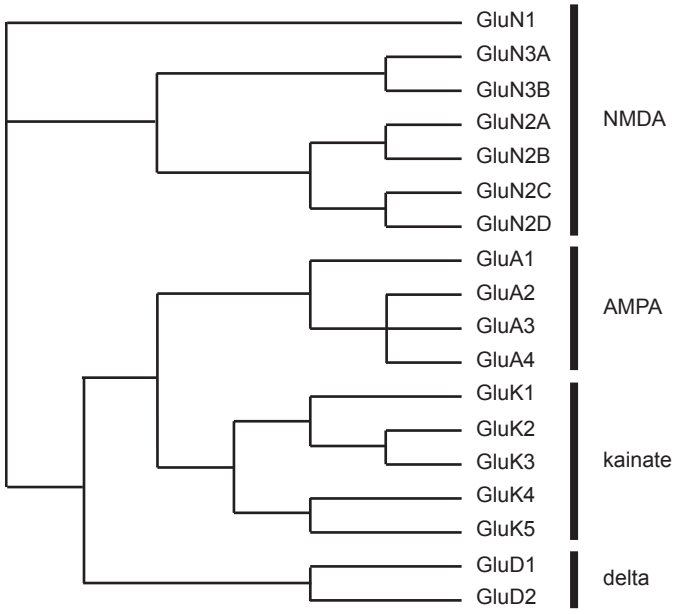


FIGURE 1.3 – Arbre phylogénétique de la famille des iGluRs. D'après Nishi et al. (2001).

1.2.1 Diversité moléculaire et rôles physiologiques des iGluRs

Les récepteurs AMPA

Les récepteurs AMPA sont responsables de la majorité de la transmission synaptique excitatrice rapide dans le système nerveux central. Ils lient le glutamate avec une faible affinité (EC_{50} de 100 à 500 μM) et sont caractérisés par des cinétiques d'activation et de désactivation très rapides, avec des temps caractéristiques inférieurs à la milliseconde (voir FIGURE 1.4 et Dingledine et al., 1999; Attwell and Gibb, 2005). Lors d'une aplication prolongée de glutamate, ces récepteurs, une fois activés, désensiblisent très rapidement et très profondément, avec des cinétiques de l'ordre de la milliseconde aussi. À

la synapse, les récepteurs AMPA permettent donc une dépolarisation rapide et transitoire de l'élément postsynaptique. Dans certains types cellulaires, on trouve aussi des récepteurs AMPA présynaptiques qui régulent la libération de neurotransmetteur (Pinheiro and Mulle, 2008). Par exemple, aux synapses cellule en panier-cellule de Purkinje, les récepteurs AMPA présynaptiques sont activés par le glutamate libéré par les fibres parallèles voisines (phénomène de "spillover") et diminuent la libération de GABA (Pinheiro and Mulle, 2008).

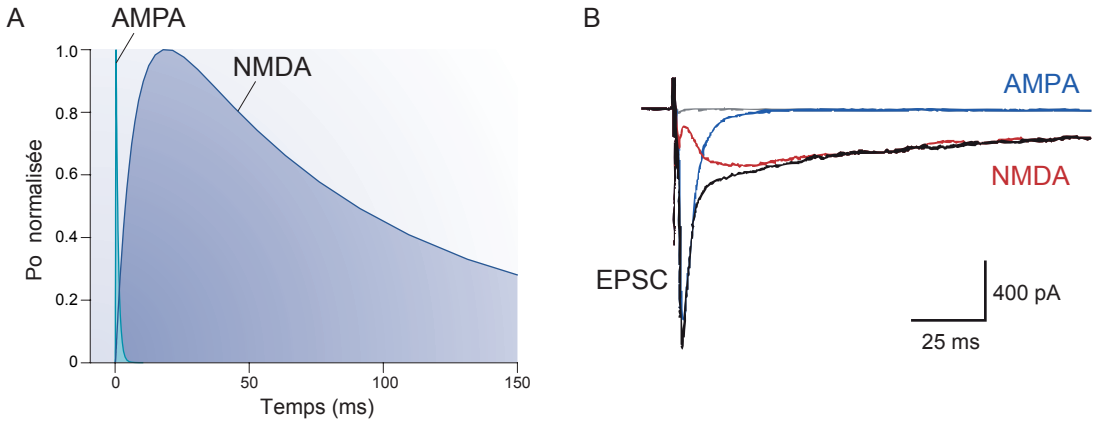


FIGURE 1.4 – Propriétés cinétiques des récepteurs AMPA et NMDA. A, Cinétiques d'activation et de désactivation des récepteurs AMPA et NMDA en réponse à une application de 0,3 ms de glutamate à 1 mM. Po, probabilité d'ouverture. D'après (Attwell and Gibb, 2005). B, Les deux composantes du courant postsynaptique excitateur. Courants postsynaptiques excitateurs (EPSC) enregistrés sur un neurone hippocampal de rat en conditions contrôle (trace noire), en présence de 50 μM de D-AP5 (inhibiteur compétitif des récepteurs NMDA ; trace bleue), en présence de 5 μM de CNQX (inhibiteur compétitif des récepteurs AMPA ; trace rouge) et en présence de D-AP5 et CNQX (trace grise). Les courants ont été mesurés à un potentiel imposé de -60 mV en l'absence de magnésium dans le milieu extracellulaire. Image reproduite à partir de l'article de Tong and Jahr (1994).

Les récepteurs AMPA sont des tétramères formés à partir de quatre types de sous-unités, GluA1-4 (anciennement GluR1-4) codées par quatre gènes différents (Dingledine et al., 1999 ; FIGURE 1.3). Ces récepteurs peuvent former des homo ou des hétérotétramères qui ont des propriétés cinétiques et pharmacologiques différentes selon le type de sous-unité incorporée. Cette diversité fonctionnelle est renforcée par la modification post-transcriptionnelle de certaines sous-unités. Ainsi, les quatres sous-unités GluA1-4 existent

sous la forme de deux variants d'épissage, flip et flop, qui sont encodés par les exons 14 et 15, situés juste avant le segment transmembranaire M4 (Sommer et al., 1990). Les variants flip sont dominants avant la naissance, alors que l'expression des variants flop augmente après la naissance pour atteindre, chez les animaux adultes, le même niveau d'expression que les variants flip (Dingledine et al., 1999). Cet épissage alternatif modifie les propriétés cinétiques et pharmacologiques des récepteurs AMPA, les variants flip désensibilisant moins profondément et moins vite que les variants flop. Les variants flip et flop ont en outre des sensibilités différentes pour les modulateurs allostériques positifs des récepteurs AMPA. Les sous-unités GluA2 et GluA4 présentent d'autres variants d'épissage au niveau de leur extrémité C-terminale, donnant lieu à des régions intracellulaires plus ou moins longues. Cet épissage alternatif semble jouer un rôle dans les interactions des récepteurs avec les protéines intracellulaires et dans l'agrégation des récepteurs. Des modifications supplémentaires sont apportées par l'edition de l'ARN messager codant pour la sous-unité GluA2. Sur cette sous-unité, un codon glutamine peut être édité en codon arginine par déamination enzymatique d'une adénosine en inosine. L'inosine peut s'associer en paire de la même façon qu'une guanosine, changeant ainsi la nature de l'acide aminé codé (Sommer et al., 1991). Le site d'édition, appelé site Q/R, est situé dans la boucle réentrante P, au niveau le plus étroit du canal ionique (voir Section 1.2.2). L'introduction de cette arginine, chargée positivement, dans le canal ionique des récepteurs AMPA a de nombreuses conséquences fonctionnelles. En effet, l'arginine a tendance à empêcher le passage des cations, ce qui fait que les récepteurs AMPA contenant une version éditée de GluA2 sont faiblement perméables au calcium et ont une plus faible conductance (Burnashev et al., 1992; Hume et al., 1991). Les récepteurs AMPA ne contenant pas de sous-unité éditée sont bloqués, à potentiel dépolarisé, par des polyamines intracellulaires (phénomène d"'inward rectification"). L'introduction d'une arginine au site Q/R abolit en outre le blocage des récepteurs par les polyamines, donnant lieu à des récepteurs ayant une courbe courant-potentiel linéaire (Verdoorn et al., 1991). On considère qu'à l'âge adulte, la grande

majorité des sous-unités GluA2 sont sous forme éditée. On distingue alors deux populations de récepteurs AMPA : les récepteurs “sans GluA2” (“GluA2-lacking receptors”) qui sont perméables au calcium et bloqués par les polyamines intracellulaires, et les récepteurs AMPA “contenant GluA2” (“GluA2-containing receptors”) imperméables au calcium et non bloqués par les polyamines intracellulaires. La plupart des récepteurs AMPA sont des hétéromères contenant la sous-unité GluA2 et l’une des sous-unités suivantes : GluA1, GluA3 ou GluA4 (Dingledine et al., 1999; Greger et al., 2007). Ils sont donc imperméables au calcium. On trouve des récepteurs “sans GluA2” principalement dans les interneurones (homomères GluA1).

Les récepteurs kaïnate

Les récepteurs kaïnate sont formés à partir de cinq types de sous-unités, GluK1-5 (anciennement GluR5-7 et KA1-2 ; Figure 1.3). Alors que les sous-unités GluK1-3 peuvent former des canaux homomériques, les sous-unités GluK4-5 ne le peuvent pas ; elles modulent l’activité des récepteurs kaïnate en formant des hétéromères avec les sous-unités GluK1-3 (Dingledine et al., 1999). De la même façon que les sous-unités AMPA GluA2, les sous-unités GluK1 et GluK2 sont sujettes à édition au niveau du site Q/R, rendant les récepteurs kaïnate contenant des sous-unités éditées en arginine imperméables au calcium. Cependant, contrairement aux sous-unités GluR2, la proportion de sous-unités éditées est moins importante et soumise à régulation. À l’âge adulte, on estime en effet que environ 50 % des sous-unités GluK1 et 80 % des sous-unités GluK2 sont éditées (Dingledine et al., 1999). Les ARNm codant pour les sous-unités kaïnate ne sont pas soumis à l’épissage alternatif au niveau du site “flip/flop”. Cependant, les sous-unités GluK1-3 présentent différents variants d’épissage au niveau de leur extrémité C-terminale. Comme pour les récepteurs AMPA, cet épissage modifie les interactions que font les récepteurs kaïnate avec les protéines intracellulaires.

À la synapse, les récepteurs kaïnate sont présents soit de façon postsynaptique, soit

de façon présynaptique. Ainsi, à la synapse fibre moussue-CA3, les récepteurs kainate participent à la formation des courants postsynaptiques excitateurs (EPSC), de la même façon que les récepteurs AMPA et NMDA (Vignes and Collingridge, 1997; Mulle et al., 1998). Cet effet est néanmoins très minoritaire par rapport aux dépolarisations induites par les récepteurs AMPA et NMDA. Les récepteurs kaïnate recombinants ont des propriétés similaires aux récepteurs AMPA : ils possèdent la même faible affinité pour le glutamate et leurs cinétiques d'activation, de désactivation et de désensibilisation sont aussi rapides, de l'ordre de la milliseconde (Dingledine et al., 1999). Cependant, les récepteurs kaïnate synaptiques ont des cinétiques beaucoup plus lentes, et une affinité apparente plus élevée pour le glutamate (Lerma, 2003). Cette différence de phénotype est encore inexpliquée, mais il se pourrait qu'elle soit due à une ou plusieurs protéines s'associant aux récepteurs kaïnate in vivo (Lerma, 2003).

Les récepteurs kaïnate jouent surtout un rôle important de façon présynaptique, où ils modulent la libération de glutamate (Lerma, 2006). Le rôle des récepteurs kaïnate présynaptiques a été bien caractérisé dans l'hippocampe, à la synapse fibre moussue-CA3. Lors de l'application d'une faible concentration de kaïnate, ces récepteurs induisent une augmentation de la libération de glutamate, alors qu'ils la diminuent lorsque la concentration de kaïnate appliquée est importante. On considère que l'augmentation de la libération du glutamate est induite par l'activation des récepteurs kaïnate qui, en ouvrant leur canal ionique, provoquent la dépolarisation de la membrane présynaptique. Par contre, l'inhibition de la libération de glutamate par les récepteurs kaïnate dépend d'un mécanisme complètement différent, qui passe par l'activation d'une protéine G. Dans les cellules de ganglion de racine dorsale, il a en effet été montré que l'activation des récepteurs kaïnate entraînait, par le biais d'une voie de type métabotropique indépendante du flux ionique à travers la canal du récepteur, une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et l'inhibition des canaux calcium voltage-dépendants de type N (Rozas et al., 2003). Le mécanisme permettant le couplage entre l'activation des récepteurs et l'activation d'une

protéine G n'a pas encore été élucidé, mais il semble faire intervenir les récepteurs kainate contenant les sous-unités GluK1-3, et pas GluK4-5 (Fernandes et al., 2009).

Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des tétramères formés à partir de sept types de sous-unités encodées par sept gènes différents : GluN1, GluN2A-D et GluN3A-B (anciennement NR1, NR2A-D et NR3A-B ; Dingledine et al., 1999 ; FIGURE 1.3). Ces sous-unités partagent globalement une très faible identité de séquence (environ 5 %), mais l'identité de séquence est plus importante entre sous-unités d'une même famille ($\sim$ 26 % pour les sous-unités GluN2 et $\sim$ 50 % pour GluN3). Les récepteurs NMDA forment une classe à part parmi les iGluRs, ayant des propriétés biophysiques et pharmacologiques différentes des récepteurs AMPA et kainate. Les singularités des récepteurs NMDA sont les suivantes :

- Ils forment obligatoirement des hétérotétramères ;
- Leur activation nécessite la liaison de deux agonistes différents, le glutamate (sur les sous-unités GluN2) et la glycine (ou la D-sérine, sur les sous-unités GluN1 et GluN3) ;
- Leurs cinétiques d'activation et de désactivation sont lentes (voir FIGURE 1.4) ;
- Ils sont fortement perméables au calcium ;
- Ils sont bloqués par les ions Mg^{2+} extracellulaires ;
- Leur activité est modulée par de nombreux agents extracellulaires tels que les protons ou le zinc, présents de façon endogène dans le cerveau (voir Chapitre 3)

Ces propriétés particulières sont ensuite modulées par la nature des sous-unités incorporées au sein des récepteurs NMDA.

Diversité moléculaire des récepteurs NMDA. Contrairement aux récepteurs AMPA et kaïnate qui peuvent former des homomères, les récepteurs NMDA forment exclusivement des hétérotétramères majoritairement composés de deux sous-unités GluN1 et de deux

sous-unités GluN2 (Cull-Candy et al., 2001; Paoletti and Neyton, 2007). Les récepteurs NMDA incorporent le plus souvent deux sous-unités GluN2 identiques, mais ils peuvent aussi comporter deux sous-unités GluN2 différentes, formant alors des trihétéromères. De nombreuses études ont mis en évidence l'existence des hétérotrimères suivants : GluN1/GluN2A/GluN2B, GluN1/GluN2A/GluN2C, GluN1/GluN2B/GluN2D et GluN1/GluN2A/GluN2D (Sheng et al., 1994; Chazot et al., 1994; Chazot and Stephenson, 1997; Luo et al., 1997; Dunah et al., 1998; Brickley et al., 2003; Hatton and Paoletti, 2005). Actuellement, par manque d'outils pharmacologiques ciblant spécifiquement les trihétéromères GluN1/GluN2, leur fonction est encore peu connue. Les sous-unités GluN3 peuvent s'associer avec les sous-unités GluN1 pour former des récepteurs GluN1/GluN3 exclusivement activés par la glycine (Chatterton et al., 2002; Ulbrich and Isacoff, 2008). Ce type de récepteur a cependant été observé uniquement en système recombinant (ovocyte de Xénope ou cellule HEK). In vivo, les sous-unités GluN3 s'associeraient plutôt sous-forme de trihétéromères avec les sous-unités GluN1 et GluN2 (Tong et al., 2008). Les récepteurs NMDA contenant une sous-unité GluN3 ont de plus faibles conductances (Das et al., 1998), sont faiblement perméables au calcium et sont très peu bloqués par le magnésium (Nishi et al., 2001; Matsuda et al., 2002). Contrairement aux récepteurs AMPA et kainate, les sous-unités des récepteurs NMDA ne sont pas éditées et possèdent une asparagine à la position équivalente au site Q/R des récepteurs AMPA (cette position est alors appelée site Q/R/N). Ceci explique en partie la forte perméabilité au calcium des récepteurs NMDA (Sakurada et al., 1993). Les propriétés d'imperméabilité au calcium des sous-unités GluN3 sont probablement dues au fait qu'elles possèdent une arginine (un résidu positivement chargé) en position $n + 1$ du site Q/R/N (Nishi et al., 2001).

La sous-unité GluN1 existe sous la forme de huit variants d'épissage obtenus à partir de trois exons : l'exon 5 dans le domaine N-terminal et les exons 21 et 22 dans la région C-terminale. La sous-unité GluN1 la plus couramment exprimée est celle contenant les exons 21 et 22, mais pas l'exon 5 (sous-unité GluN1-1a). Les sous-unités GluN1

contenant l'exon 5 (sous-unités GluN1-1b ou GluN1b) présentent une boucle surnuméraire au niveau du bas du lobe II de leur domaine N-terminal (voir discussion de l'Article IV et FIGURE 7.19, page 311). L'épissage alternatif au niveau de l'exon 5 a de nombreuses conséquences fonctionnelles. En effet, les récepteurs NMDA contenant l'exon 5 ont une moins bonne affinité pour le glutamate (Durand et al., 1993) et sont moins sensibles à certains modulateurs allostériques tels que les protons, le zinc ou les polyamines (Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1995, 1998 et voir Chapitre 3). Les exons C-terminaux 21 et 22 sont impliqués dans les interactions de la sous-unité GluN1 avec des effecteurs intracellulaires. Ainsi, l'exon 21 contient des sites de phosphorylation pour la protéine kinase C et se lie à la calmoduline (Salter and Kalia, 2004; Lau and Zukin, 2007). L'exon 22 est quant à lui impliqué dans l'export des récepteurs NMDA du réticulum endoplasmique granuleux vers la membrane plasmique (Mu et al., 2003).

Distribution spatio-temporelle. Les différentes sous-unités GluN2 et GluN3 ont des profils d'expression spatiaux et temporels distincts. Dans l'embryon et lors des premiers stades après la naissance, les sous-unités GluN2 majoritairement exprimées sont GluN2B et GluN2D qui sont présentes dans l'ensemble du système nerveux central. Les sous-unités GluN1, obligatoires pour la formation des récepteurs NMDA, sont ubiquitaires dans le cerveau à tous les stades du développement (Akazawa et al., 1994; Monyer et al., 1994). Au cours du développement, l'expression des sous-unités GluN2D diminue vers P7-P10 au profit des sous-unités GluN2A et GluN2C, qui les remplacent progressivement. Le profil d'expression des sous-unités GluN2B se restreint progressivement au cerveau antérieur (voir FIGURE 1.5). À l'âge adulte, la sous-unité GluN2A est exprimée dans l'ensemble du cerveau (FIGURE 1.6). En revanche, les autres sous-unités GluN2 ont des profils d'expression plus restreints. Ainsi, GluN2B, chez l'adulte, est essentiellement exprimée dans les parties antérieures du cerveau, telles que le cortex et l'hippocampe, alors que GluN2C est présente dans le cervelet. GluN2D, qui est fortement exprimée aux stades précoces de

développement, est peu exprimée à l'âge adulte et sa localisation est restreinte à quelques régions du cerveau telles que le diencéphale et le mésencéphale (Watanabe et al., 1993). Les sous-unités GluN3 sont aussi soumises à une régulation spatio-temporelle, la sous-unité GluN3A étant surtout exprimée pendant le développement, même si elle reste présente, à l'âge adulte, dans de nombreuses populations neuronales (Sucher et al., 1995; Wong et al., 2002) ainsi que dans les oligodendrocytes (Salter and Fern, 2005; Karadottir et al., 2005; Micu et al., 2006). À l'âge adulte, la sous-unité GluN3B a un profil d'expression très restreint, étant principalement localisée dans les motoneurones du tronc cérébral et de la moëlle épinière (Nishi et al., 2001).

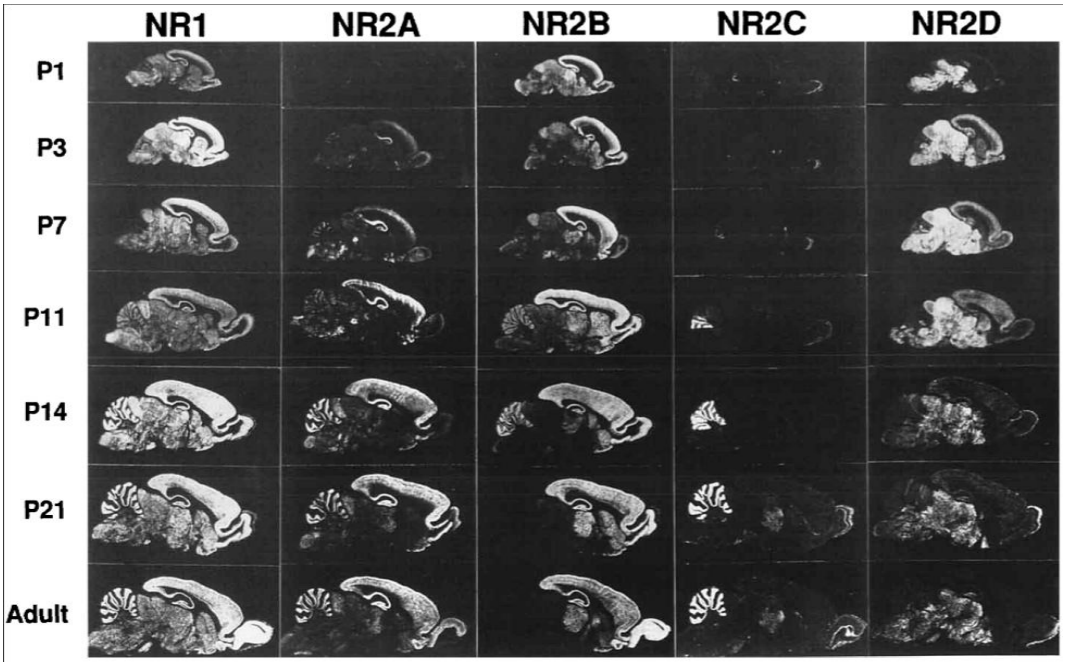


FIGURE 1.5 – Évolution de la distribution des ARNm codant pour les sous-unités GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D dans des cerveaux de rats âgés de 1, 3, 7, 11, 14, 21 et 56 jours. D'après Akazawa et al. (1994)

Les récepteurs NMDA sont présents de façon postsynaptique et participent, de concert avec les récepteurs AMPA, à la transmission synaptique excitatrice (FIGURE 1.4). Cependant, des récepteurs NMDA ont aussi été mis en évidence dans des compartiments périsynaptiques (récepteurs situés juste à l'extérieur de la densité post-synaptique) et ex-

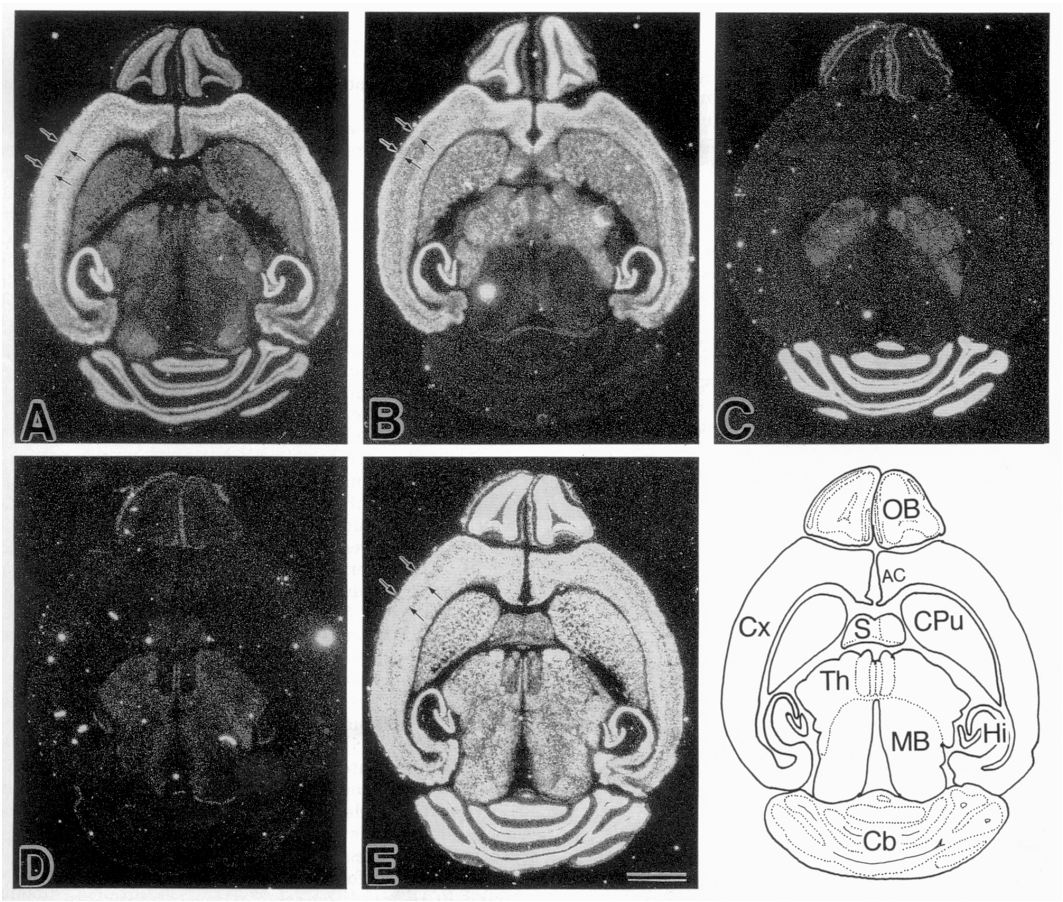


FIGURE 1.6 – Distribution des ARNm codant pour les sous-unités GluN2A (A), GluN2B (B), GluN2C (C), GluN2D (D) et GluN1 (E) dans un cerveau de souris 21 jours après la naissance. AC, cortex cingulaire antérieur ; Cx, cortex cérébral ; Cb, cervelet, CPu, striatum ; Hi, hippocampe, MB, mésencéphale ; OB, bulbe olfactif ; S, septum ; Th, thalamus. D'après Watanabe et al. (1993).

trasynaptiques (récepteurs éloignés de la synapse) (Kohr, 2006). Là encore, la nature des sous-unités semble influer sur la répartition sub-cellulaire des récepteurs NMDA. Dans les synapses glutamatergiques immatures, il est bien établi que les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B sont prédominants (voir paragraphe précédent) et sont responsables de la transmission synaptique excitatrice. Pendant la maturation, l'augmentation de l'expression de la sous-unité GluN2A se traduit généralement par une accélération des temps de décroissance des EPSC et par une diminution de la sensibilité des EPSC aux antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B (Cull-Candy et al., 2001). De nombreuses études ont montré qu'à une synapse mature, les compartiments périsynaptique et extrasynaptique sont enrichis en sous-unités GluN2B (et GluN2D), alors que le compartiment postsynaptique (région occupée par la densité post-synaptique) est enrichi en GluN2A (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Kohr, 2006). Les récepteurs extrasynaptiques sont probablement activés par diffusion du glutamate provenant d'afférences voisines ou par la libération de glutamate par les cellules gliales (Hamilton and Attwell, 2010). Cependant, cette ségrégation n'est pas claire et varie en fonction de la région du cerveau et du type de synapse considérés. Des récepteurs NMDA postsynaptiques contenant la sous-unité GluN2B ont par exemple été mis en évidence dans certaines synapses de l'amygdale et de la couche 5 du néocortex (Lopez de Armentia and Sah, 2003; Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). De même, il existe aussi des récepteurs extrasynaptiques contenant la sous-unité GluN2A (Kohr, 2006; Thomas et al., 2006). Enfin, à certaines synapses, les récepteurs NMDA sont aussi présents de façon présynaptique, où ils augmentent généralement la libération de glutamate et participent, de la même façon que les récepteurs NMDA postsynaptiques, à des formes de plasticité synaptique (Bidoret et al., 2009). Il semblerait que les récepteurs NMDA pré-synaptiques contiennent majoritairement la sous-unité GluN2B (Pinheiro and Mulle, 2008).

Propriétés biophysiques et pharmacologiques. La nature de la sous-unité GluN2 incorporée dans les récepteurs NMDA détermine aussi les propriétés biophysiques et pharmacologiques de ces récepteurs. Nous avons vu que l'activation des récepteurs NMDA nécessite la liaison de deux agonistes différents, la glycine (ou la D-sérine) se liant sur la sous-unité GluN1 (et GluN3) et le glutamate sur la sous-unité GluN2 (Furukawa et al., 2005; Yao et al., 2008). Des études d'électrophysiologie ont montré que l'activation des récepteurs NMDA requiert l'occupation simultanée de deux sites pour la glycine et deux sites pour le glutamate (Johnson and Ascher, 1987; Benveniste and Mayer, 1991; Clements and Westbrook, 1991). Durant une application continue de glutamate et de glycine à concentrations saturantes, les récepteurs NMDA ne sont pas ouverts en permanence (probabilité d'ouverture maximale, Po(max) < 1). Leur probabilité d'ouverture dépend de la sous-unité GluN2 incorporée. Les récepteurs recombinants GluN1/GluN2A ont une probabilité d'ouverture d'environ 0.5, les récepteurs GluN1/GluN2B une probabilité d'ouverture de 0.1 environ et les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D ont une probabilité d'ouverture inférieure à 0.05 (Wyllie et al., 1998; Chen et al., 1999; Erreger et al., 2005; Dravid et al., 2008; Gielen et al., 2009).

Une autre caractéristique de ces récepteurs est qu'il sont inhibés de façon tonique par les ions magnésium Mg^{2+} qui se fixent de façon "voltage-dépendante" dans le canal ionique (Nowak et al., 1984; Mayer et al., 1984). Les ions Mg^{2+} se dissocient du récepteur lorsque la membrane plasmique est dépolarisée. Ainsi, à la synapse excitatrice, les récepteurs NMDA agissent comme des détecteurs de coïncidence : ils ne sont activés que lorsque à la fois les éléments présynaptique et post-synaptique sont excités (Dingledine et al., 1999). Ce bloc magnésium introduit donc un délai dans l'activation des récepteurs NMDA par rapport aux récepteurs AMPA. Même en l'absence de magnésium, les récepteurs NMDA ont des cinétiques d'activation et de désactivation beaucoup plus lentes que les récepteurs AMPA et kainate. En effet, les EPSC réultant de l'activation des récepteurs NMDA ont des temps caractéristiques de montée de l'ordre de 10 ms

et des temps caractéristiques de décroissance (τ_{dec}) supérieurs à 100 ms (Attwell and Gibb, 2005 et FIGURE 1.4). Le temps caractéristique de présence du glutamate dans la fente synaptique étant d'environ 1 ms (Barbour and Hausser, 1997), la durée des EPSC est alors contrôlée par les temps de désactivation des récepteurs NMDA. Les cinétiques de désactivation varient considérablement selon la sous-unité GluN2 incorporée (Monyer et al., 1994; Vicini et al., 1998). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A se désactivent le plus rapidement avec un τ_{dec} d'environ 50 ms. Les récepteurs contenant les sous-unités GluN2B et GluN2C ont des cinétiques de désactivation de l'ordre d'une centaine de millisecondes ($\tau_{dec} = 400\,\text{ms}$ et $290\,\text{ms}$ pour GluN2B et GluN2C, respectivement), alors que ceux contenant la sous-unité GluN2D se désactivent très lentement ($\tau_{dec} > 1\,\text{s}$). En accord avec ces cinétiques de désactivation lentes, les récepteurs NMDA ont une forte affinité pour le glutamate ($EC_{50} \simeq 1\,\mu M$) par rapport aux récepteurs AMPA. Là encore des différences existent selon le type de sous-unité GluN2, respectant l'ordre des cinétiques de désactivation (Dingledine et al., 1999) : $EC_{50}(\text{GluN2A}) > EC_{50}(\text{GluN2B}) = EC_{50}(\text{GluN2C}) > EC_{50}(\text{GluN2D})$.

Grâce à leurs cinétiques lentes de désactivation et leur leur forte affinité pour le glutamate, les récepteurs NMDA peuvent être activés à la synapse bien que, à cause du délai imposé par la suppression du bloc magnésium, la concentration de glutamate aie fortement diminué dans la fente synaptique. En outre, ces propriétés font que les récepteurs NMDA sont ouverts pendant une longue période de temps, ce qui permet une forte entrée d'ions Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule. Le calcium intracellulaire permet ensuite l'activation de voies de signalisation induisant une plasticité synaptique (Malenka and Bear, 2004). C'est cette plasticité qui est considérée comme la base cellulaire des phénomènes de mémoire et d'apprentissage.

1.2.2 Architecture moléculaire des iGluRs

Les récepteurs ionotropiques du glutamate sont composés de quatre sous-unités arrangées en dimères de dimères (Mayer, 2006; Sobolevsky et al., 2009). Les sous-unités des iGluRs partagent une architecture commune formée à partir de la fusion de différents modules autonomes, chaque module partageant une similarité de séquence et de structure avec des protéines bactériennes distinctes. Chaque sous-unité comporte une extrémité C-terminale, un domaine transmembranaire et une importante région extracellulaire formée par le domaine de liaison des agonistes (ABD) et le domaine N-terminal (NTD) (voir FIGURE 1.7A et B et, par exemple, Mayer and Armstrong, 2004). Les structures cristallographiques obtenues pour les NTDs (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Karakas et al., 2009; Clayton et al., 2009) ou les ABDs des iGluRs en présence de nombreux agonistes, antagonistes et modulateurs (Mayer, 2006) ont permis de comprendre les relations entre la structure et la fonction de ces différents modules. Plus récemment, une structure cristallographique d'un récepteur AMPA entier (sans la partie C-terminale) a été obtenue (Sobolevsky et al., 2009). Cette structure fournit de nombreuses informations quant à l'arrangement tétramérique des iGluRs (FIGURE 1.7C).

Structure modulaire des sous-unités des iGluRs

Le domaine N-terminal (NTD) des iGluRs est formé par les $\sim$ 380 premiers résidus de la séquence protéique d'une sous-unité (FIGURE 1.7A). Des expériences de modélisation par homologie et de mutagénèse dirigée ont montré que ce domaine partage le même repliement que la protéine bactérienne périplasmique (PBP) "leucine/isoleucine/valine-binding protein" (LIVBP) et que le domaine "Venus flytrap" de la famille 3 des RCPG (O'Hara et al., 1993; Paoletti et al., 2000; Ayalon et al., 2005). Le NTD est un domaine globulaire composé de deux lobes reliés par une charnière. Ce repliement a été confirmé par l'obtention de structures cristallographiques des NTDs des sous-unités GluA2 (Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009), GluK2 (Kumar et al., 2009) et GluN2B (Karakas et al.,

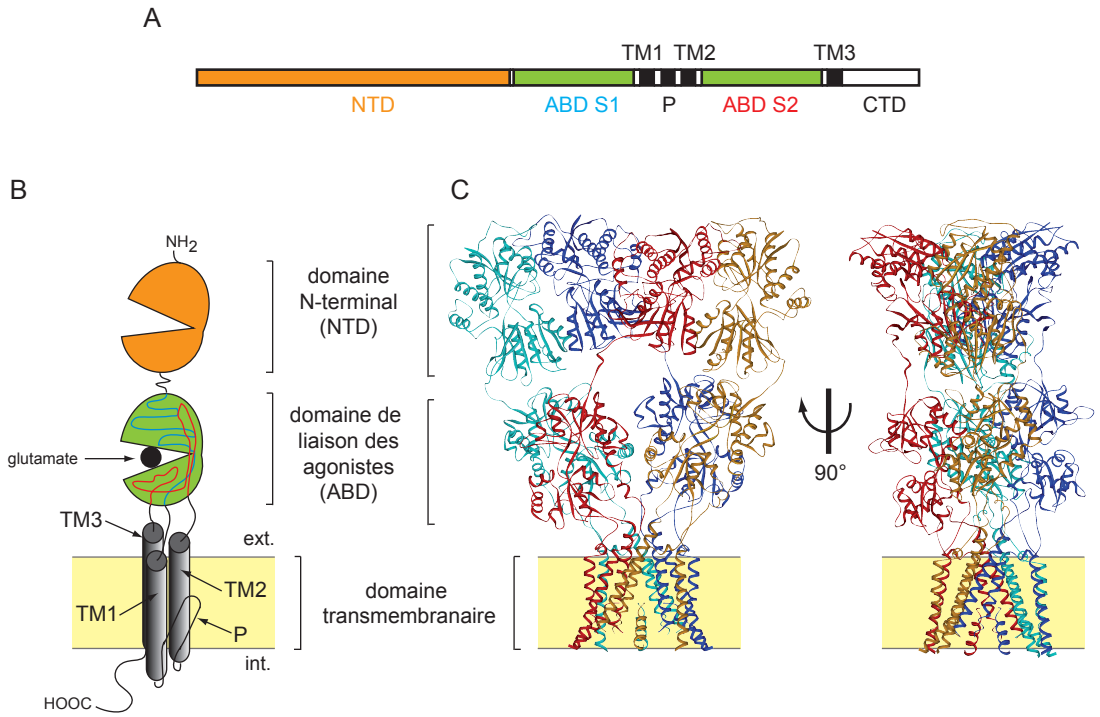


FIGURE 1.7 – Architecture moléculaire des iGluRs. A, Répartition dans la séquence protéique des différents domaines. NTD, domaine N-terminal ; ABD, domaine de liaison des agonistes ; CTD, domaine C-terminal ; M1, M2, M3, segments transmembranaires 1, 2 et 3 ; P, boucle ré-entrante P. B, Organisation schématique d'une sous-unité d'iGluR. C, Structure cristallographique d'un homotétramère AMPA GluA2 vu depuis sa "face large" et depuis sa "face étroite" (Sobolevsky et al., 2009, pdb : 3kg2). On remarque que la structure globale a un axe de symétrie C_2. La structure est représentée sous forme de ruban, chaque sous-unité ayant une couleur différente.

2009). La structure détaillée des NTDs des iGluRs sera étudiée dans le chapitre suivant, Section 2.3. Chez les protéines bactériennes périplasmiques, les deux lobes délimitent un espace interlobaire à l'intérieur duquel se lient de petites molécules (ions, acides aminés, sucres ...; Quiocho and Ledvina, 1996). C'est aussi le cas des récepteurs NMDA, où le NTD de certaines sous-unités forme le site de liaison de modulateurs allostériques tels que le zinc et l'ifenprodil (Paoletti et al., 2000; Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005; Herin and Aizenman, 2004). Par contre aucune molécule se liant dans les NTDs des récepteurs AMPA et kainate n'a pour l'instant été identifiée. Les NTDs, contrairement aux ABDs, dimérisent facilement en solution, avec des constantes de dissociation allant de quelques centaines de nanomoles par litre à quelques micromoles par litre (Clayton et al., 2009; Jin et al., 2009; Kumar et al., 2009). En accord avec cette propriété, les NTDs des iGluRs jouent un rôle important dans l'association spécifique des sous-unités au sein d'une même classe (Ayalon and Stern-Bach, 2001; Ayalon et al., 2005; Meddows et al., 2001; Papadakis et al., 2004). Les structures cristallographiques ont révélé qu'il existe une boucle coiffant le sommet du lobe I qui est impliquée dans la reconnaissance des NTDs (Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009; Kumar et al., 2009). De façon intéressante, pour les récepteurs AMPA et kainate, cette boucle est conservée au sein d'une même classe d'iGluRs, mais pas entre classes (voir Chapitre 2, FIGURE 2.10 page 91). Cette boucle pourrait donc jouer un rôle dans l'exclusion entre sous-unités de classes différentes (voir Section 2.3). Il est intéressant de noter, par contre, que cette boucle est très variable au sein des différentes sous-unités des récepteurs NMDA (Karakas et al., 2009). Cette variabilité pourrait aussi être à l'origine de l'hétéromérisation sélective des récepteurs NMDA.

Le domaine de liaison des agonistes (ABD) est composé de deux segments, S1 et S2, séparés dans la séquence protéique par l'insertion de trois segments transmembranaires formant le canal ionique (FIGURE 1.7A et B ; Sternbach et al., 1994). Ce domaine partage des similarités de séquence avec des protéines bactériennes périplasmiques telles que la "leucine/arginine/ornithine-binding protein" (LAOBP) et la "glutamine-binding protein"

(QBP). Ces protéines possèdent aussi une structure bilobaire mais leur repliement est différent de la LIVBP et du NTD. En particulier, la charnière reliant les deux lobes contient deux segments dans le cas du domaine de liaison des agonistes, alors que la charnière du NTD en contient trois. Le glutamate (et la glycine pour les sous-unités GluN1 et GluN3) se lie entre les deux lobes, entraînant la fermeture du domaine (voir Section 1.3). De nombreuses structures cristallographiques ont été obtenues pour les ABDs des sous-unités des différentes classes d'iGluRs (voir, par exemple, Armstrong et al., 1998; Furukawa and Gouaux, 2003; Mayer, 2005; Furukawa et al., 2005) et ont montré que la structure et l'arrangement des ABDs étaient globalement conservés. Nous les étudierons plus en détail lorsque nous décrirons les mécanismes d'activation des iGluRs (Section 1.3).

La partie transmembranaire est composée de trois hélices TM1, TM2 et TM3 et d'une boucle réentrante ou boucle du pore P. Les segments TM1 et TM2 et la boucle P interrompent la séquence du domaine de liaison des agonistes, alors que l'hélice TM3 est située après le segment S2 (Figure 1.7A et B). L'association des segments TM1, P et TM2 des quatre sous-unités forme le canal ionique à proprement parler. Ces trois segments adoptent un repliement similaire aux canaux potassiques (Wollmuth and Sobolevsky, 2004). L'hélice TM1 est précédée d'une petite hélice de quelques acides aminés (Sobolevsky et al., 2009). Cette dernière, appelée hélice pré-TM1, est parallèle à la membrane plasmique et établit des contacts avec les hélices TM2 et TM3. L'hélice pré-TM1 joue probablement un rôle important dans le mécanisme d'ouverture du canal en restreignant la mobilité de l'hélice TM2 (voir plus bas). La boucle réentrante P est en réalité composée d'une hélice (qu'on appellera hélice P) et d'une boucle qui est désordonnée sur la structure cristallographique du récepteur complet GluA2 (Figure 1.8A). Cette boucle constitue l'endroit le plus étroit du canal ionique et forme le filtre de sélectivité des iGluRs. On y trouve, à l'extrémité de l'hélice P, le site Q/R/N, où une glutamine est éditée en arginine dans les sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA (voir Section 1.2.1). C'est donc cette région détermine les conductances du canal ionique pour les ions Na^+, K^+ et Ca^{2+} (Sakurada et al., 1993). Chez

les récepteurs NMDA, la boucle P contient en outre les déterminants du bloc magnésium (Mori et al., 1992). Les hélices TM2 sont impliquées dans le mécanisme d'ouverture du canal ionique à proprement parler. Dans la structure cristallographique du récepteur complet GluA2 qui représente un canal fermé, les quatre hélices TM2 se croisent et forment un étranglement du côté de la partie extracellulaire qui empêche le passage des ions (Figure 1.8). Le croisement se fait au niveau du motif SYTANLAAF, conservé parmi les iGluRs (en bleu foncé sur la Figure 1.8A). C'est ce motif qui forme la "porte" du canal, c'est-à-dire qui permet au canal ionique de s'ouvrir ou de se fermer (mécanisme de "gating" ; Chang and Kuo, 2008). Chez la souris "lurcher", la mutation de l'alanine 636 (SYTANLAAF) de la sous-unité GluD2 en thréonine rend les récepteurs $\delta 2$ constitutivement actifs (Zuo et al., 1997). Cette alanine interagit avec l'hélice TM2 voisine, confirmant l'importance de l'organisation des hélices TM2 dans les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal ionique. Enfin, l'hélice TM3 est située à l'extérieur du pore. Sa fonction est encore mal définie, mais les mutants ne comportant pas cette hélice ne forment pas de canal fonctionnel (Schorge and Colquhoun, 2003). La structure cristallographique de Sobolevsky et al. (2009) montre que cette hélice interagit avec les hélices TM1 et TM2 de la sous-unité voisine, suggérant un rôle important de l'hélice TM3 dans l'assemblage du canal ionique.

Enfin, la région C-terminale est la partie la plus divergente des iGluRs et sa longueur peut varier de 20 à 500 résidus selon les sous-unités. Elle est impliquée dans le trafic des iGluRs et dans leurs interactions avec des protéines du cytosquelette et des éffecteurs intracellulaires (Salter and Kalia, 2004; Lau and Zukin, 2007).

Organisation tétramérique des iGluRs

Comme nous l'avons dit précédemmment, les iGluRs sont des dimères de dimères. Grâce aux nombreuses structures cristallographiques de domaines extracellulaires isolés (ABDs puis, plus récemment, NTDs), l'arrangement dimérique des sous-unités est plutôt

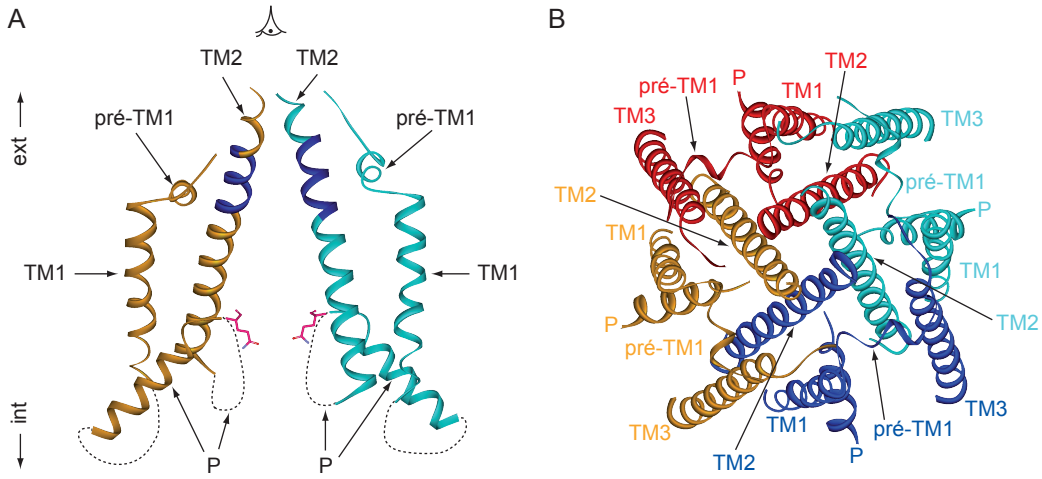


FIGURE 1.8 – Structure du pore des iGluRs en conformation fermée, d'après la structure cristallographique du récepteur entier GluA2 (Sobolevsky et al., 2009 ; pdb : 3kg2). A, Arrangement des hélices transmembranaires du canal ionique des iGluRs vu de façon parallèle à la membrane plasmique. Pour plus de clarté, seules deux sous-unités sont représentées et les hélices TM3 ont été enlevées. Les boucles désordonnées dans la structure cristallographique sont représentées en pointillé. La région SYTANLAAF (porte du canal) est colorée en bleu foncé. La glutamine du site Q/R/N est représentée en rose sous forme de bâtonnets. B, arrangement tétramérique du canal ionique vue depuis la face extracellulaire (direction indiquée par l'oeil en A). Chaque sous-unité a une couleur différente.

bien connu. La structure cristallographique obtenue pour le récepteur entier homomérique GluA2 nous donne des informations quant à l'arrangement relatif des deux dimères (Sobolevsky et al., 2009). Le récepteur entier a une symétrie globale d'axe C_2, résultat qui est en accord avec l'organisation d'un récepteur en dimère de dimères. Le récepteur présente une face "étroite" et une face "large" qui a la forme d'un "Y", le canal ionique formant le pied du "Y" et les domaines extracellulaires en représentant les bras (FIGURE 1.7C et FIGURE 1.9). La cristallographie confirme donc les résultats de microscopie électronique qui avaient été réalisés sur des récepteurs AMPA natifs (Nakagawa et al., 2005, 2006). Le récepteur homomérique GluA2 est organisé en trois couches séparées par des boucles ou liens (FIGURE 1.9 et FIGURE 1.10A). La couche des segments transmembranaires a une symétrie d'axe C_4, alors que les couches des ABDs et des NTDs ont des symétries d'axe C_2. Dans les couches des ABDs et des NTDs, les différentes sous-unités forment des dimères parfaitement superposables à ceux qui avaient été cristallisés auparavant de façon isolée

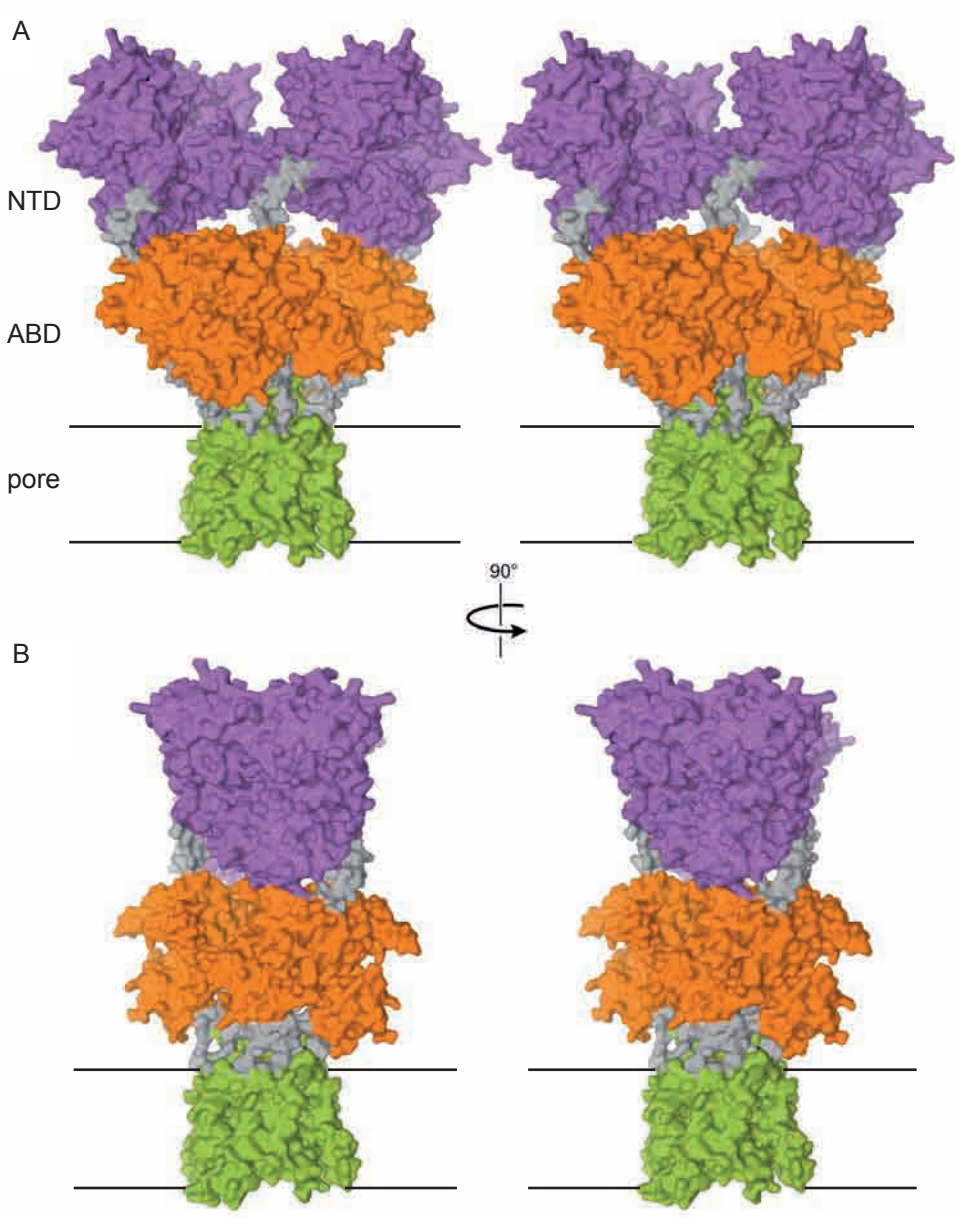


FIGURE 1.9 – Le récepteur homomérique GluA2 est organisé en trois couches. Représentation de la surface accessible au solvant du récepteur vu depuis sa face large (A) et depuis sa face étroite (B). Le pore est coloré en vert, les ABDs en orange, les NTDs en violet et les liens inter-domaines en gris. D'après Sobolevsky et al. (2009).

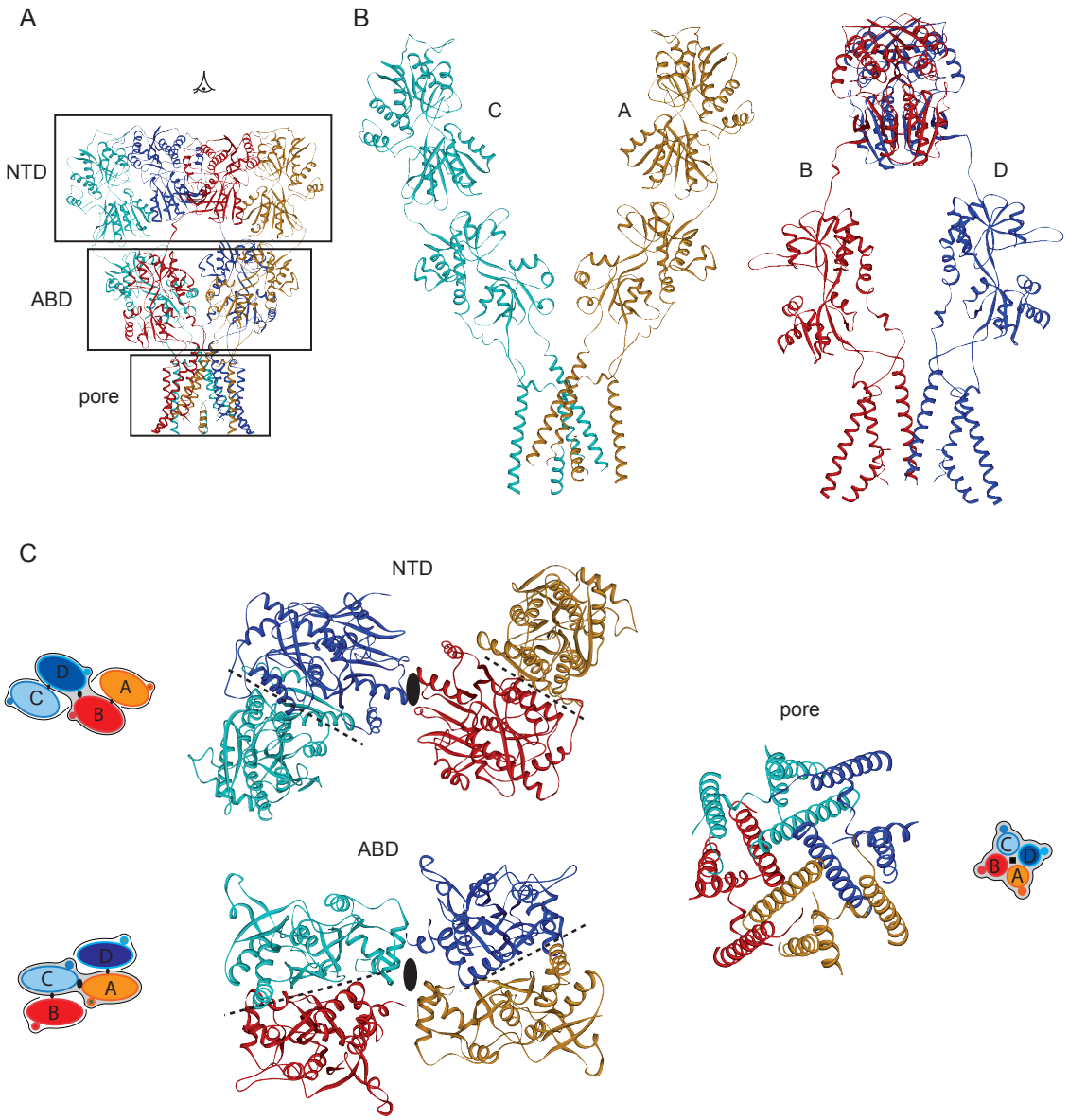


FIGURE 1.10 – Au sein du tétramère, les quatre sous-unités ne sont pas équivalentes. Cette figure a été adaptée à partir de l'article de Sobolevsky et al. (2009). A, Différentes couches (NTD, ABD et pore) du récepteur GluA2 tétramérique. B, Représentation des deux conformations différentes de sous-unités. C, différentes couches du tétramère vue depuis le sommet du récepteur (direction indiquée par l'oeil en A). L'axe de symétrie C_2, qui correspond aussi à l'interface de tétramérisation, est représenté par un ovale noir. Les interfaces de dimérisation sont représentées par des traits pointillés.

(Sobolevsky et al., 2009; Jin et al., 2009; Armstrong and Gouaux, 2000). Cette structure cristallographique de récepteur entier confirme donc le fait que les récepteurs NMDA ont une architecture modulaire composée de domaines semi-autonomes. Ce résultat confirme aussi la pertinence de l'approche de domaines isolés. Les NTDs présentent une importante interface de dimérisation qui fait intervenir les deux lobes de chacun de deux des domaines, impliquant des régions situées sur les "côtés" des NTDs (par rapport à la charnière, voir Kumar et al., 2009 et Section 2.3). En revanche les ABDs dimérisent exclusivement par le biais des lobes I, de manière "dos-à-dos", les charnières des deux domaines étant en contact (voir Kumar et al., 2009 et FIGURE 1.10C). Deux dimères interagissent ensuite entre eux pour former une interface de tétramérisation, située au niveau de l'axe de symétrie C_2. L'interface de tétramérisation est moins étendue que les interfaces de dimérisation (FIGURE 1.10C), ce qui est en accord avec le fait que les domaines isolés ont été cristallisés sous forme de dimères. Pour les NTDs, l'interface de tétramérisation se fait entre les deux sous-unités centrales, via le bas de leurs lobes II. Les diméres de ABDs, quant à eux, tétramérisent par le "côté" des lobes II des sous-unités centrales. De façon remarquable, on observe une rupture de symétrie entre la couche des ABDs et la couche des NTDs. En effet, les sous-unités centrales impliquées dans la tétramérisation ne sont pas les mêmes au niveau des ABDs et des NTDs. Dans la couche des ABDs, les sous-unités A et D, d'un côté, et B et C, de l'autre côté forment des dimères et l'interface de tétramérisation fait intervenir les sous-unités A et C (voir FIGURE 1.10C). Dans la couche des NTDs, l'arrangement est différent, car la dimérisation se fait entre les sous-unités A et B, d'une part et C et D, d'autre part, et l'interface de dimérisation fait intervenir les sous-unités B et D. La pertinence de cet arrangement pour GluA2 a été démontrée par des expériences de couplages par ponts disulfures au niveau des interfaces de tétramérisation des ABDs et des NTDs (Sobolevsky et al., 2009). Le croisement qui a lieu entre la couche d'ABDs et la couche de NTDs est permis par la non-équivalence des sous-unités formant le tétramère. En effet, bien que les quatre sous-unités aient toutes la même séquence protéique (on est

en présence d'un homotétramère), on observe deux couples de sous-unités dont la conformation diffère essentiellement au niveau des segments reliant le NTD à l'ABD et l'ABD aux hélices transmembranaires. Ceci n'avait jamais été vu ni prédit auparavant dans un canal ionique. Dans les sous-unités A et C, le lien NTD-ABD est replié sur lui-même et permet au NTD d'interagir avec l'ABD situé en dessous. Par contre, dans les sous-unités B et D, le lien NTD-ABD est en conformation étendue, ce qui fait que le NTD et l'ABD des sous-unités B et D sont éloignés. Il est possible que cette non équivalence entre sous-unités aie une importance physiologique puisqu'il a été montré, chez les récepteurs NMDA, que le segment NTD-ABD de la sous-unité GluN2 participe au contrôle la probabilité d'ouverture de ces récepteurs (Gielen et al., 2009).

Cet arrangement particulier observé pour le récepteur AMPA GluA2 est-il conservé parmi les iGluRs ? Sobolevsky et al. (2009), en se basant sur les fortes similarités de structure et d'arrangement des ABDs et des NTDs entre les récepteurs AMPA et kainate, proposent que les récepteurs kainate soient arrangés de la même façon. L'existence du croisement entre ABDs et NTDs reste cependant à démontrer chez les récepteurs kainate. En ce qui concerne les récepteurs NMDA, la conservation de cet arrangement est beaucoup moins évidente. En effet, si les ABDs ont une structure similaire à ceux des récepteurs AMPA et kainate (Furukawa et al., 2005), les NTDs ont une structure et très probablement un mode de dimérisation différents (voir Karakas et al., 2009 et Section 2.3). Les récepteurs NMDA étant des hétérotétramères stricts, il se pose en outre le problème de l'arrangement relatif des sous-unités GluN1 et GluN2. Furukawa et al. (2005) ont démontré que, au niveau des ABDs des récepteurs contenant la sous-unité GluN2A, l'unité fonctionnelle est un hétérodimère GluN1/GluN2A. À partir de deux hétérodimères GluN1/GluN2, trois arrangements sont possibles au sein d'un tétramère (Figure 1.11). Auparavant, Schorge and Colquhoun (2003) ont proposé que les récepteurs NMDA sont arrangés selon le cas C de la Figure 1.11. Pour déterminer l'arrangement relatif des sous-unités GluN1 et GluN2 dans les récepteurs NMDA, Sobolevsky et al. (2009) ont introduit des cystéines

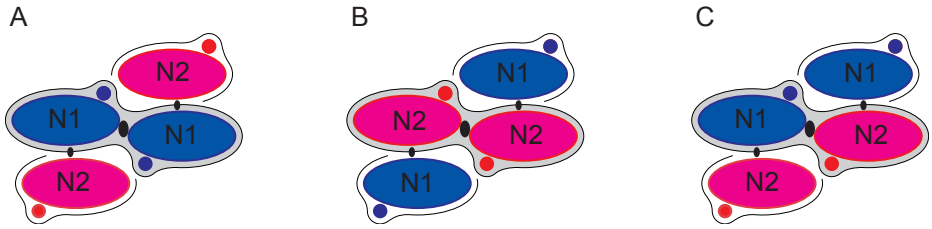


FIGURE 1.11 – Trois possibilités d'arrangement relatif des sous-unités GluN1 et GluN2 à partir d'hétérodimères GluN1/GluN2 dans la couche d'ABDs des récepteurs NMDA. L'interface de tétramérisation est représentée par un gros ovale noir, les interface de dimérisation par un petit ovale noir. Les ronds rouge et bleus représentent la position la position de la fente interlobaire.

dans les ABDs des sous-unités GluN1 et GluN2A aux positions correspondant à l'interface de tétramérisation AMPA dans les trois combinaisons possibles. Grâce à des couplages par ponts disulfure entre sous-unités, ils proposent que les sous-unités s'arrangent de telle façon que ce soient les sous-unités GluN1 qui participent à la tétramérisation au niveau des ABDs (cas A dans la FIGURE 1.11). Cependant, les résultats obtenus dans leurs expériences de pontage disulfure ne sont pas clairs. En effet, leur conclusion disant que les récepteurs NMDA s'arrangent selon le cas A de la FIGURE 1.11 repose sur le fait que, lorsqu'ils introduisent des cystéines dans l'interface putative de tétramérisation de la sous-unité GluN1 uniquement ou des sous-unités GluN1 et GluN2A à la fois, ils observent en "Western Blot" des homodimères GluN1 après pontage disulfure. Cependant, il a été montré que des homodimères GluN1/GluN1 peuvent se former spontanément (Meddows et al., 2001; Inanobe et al., 2005). De plus, lorsque des cystéines sont introduites à la fois dans les sous-unités GluN1 et GluN2A, on observe l'existence de bandes de haut poids moléculaire qui pourraient correspondre à des hétérodimères GluN1/GluN2A (Les sous-unités GluN2 ayant un poids moléculaire plus important que la sous-unité GluN1). Enfin, des résultats de microscopie à force atomique, obtenus au laboratoire et encore non publiés (en collaboration avec le groupe de Mike Edwardson à l'Université de Cambridge), laissent à penser que les ABDs des récepteurs NMDA sont arrangés selon le cas C de la FIGURE 1.11. L'arrangement relatif des sous-unités GluN1 et GluN2 est donc encore débattu à ce jour. Une inconnue réside de plus quant à l'organisation des sous-unités GluN1 et GluN2 au niveau

des NTDs. Si Sobolevsky et al. (2009) ont raison, et si le croisement entre ABDs et NTDs existe chez les récepteurs NMDA, les NTDs font des hétérodimères GluN1/GluN2 et ce sont les sous-unités GluN2 qui participent à l'interface de tétramérisation. Ces résultats devront être vérifiés par des expériences fonctionnelles et des expériences de couplage entre sous-unités au niveau des NTDs.

1.3 Mécanismes d'activation des récepteurs ionotropiques du glutamate

1.3.1 Activation, désactivation et désensibilisation des iGluRs

Le coeur du fonctionnement des iGluRs fait intervenir les ABDs et les domaines transmembranaires. Il a en effet été montré que des récepteurs AMPA ne possédant pas de NTD sont toujours fonctionnels (Pasternack et al., 2002). Les NTDs, outre leur rôle dans la reconnaissance entre sous-unités, ont plutôt un rôle modulateur de l'activité. Les structures cristallographiques obtenues pour les ABDs des différentes classes d'iGluRs ont révélé des structures et des modes de dimérisation globalement similaires, suggérant que les trois principales classes d'iGluRs ont des mécanismes de fonctionnement communs (Mayer, 2006). Les iGluRs étant des dimères de dimères, nous pouvons réfléchir sur le fonctionnement de ces récepteurs à partir de l'analyse des changements conformationnels d'un dimère de sous-unités, bien que l'arrangement tétramérique soit aussi important. Les ABDs dimérisent de manière "dos-à-dos", les crevasses interlobaires pointant vers l'extérieur du dimère. Les deux ABDs se contactent essentiellement par le biais de leurs lobes I, laissant les lobes II libres de bouger. La fixation du glutamate dans les ABDs entraîne la fermeture des domaines grâce à la rotation des lobes 2 (voir Armstrong and Gouaux, 2000; Mayer, 2005; Furukawa et al., 2005 et Figure 1.12). Le glutamate se lie selon un mécanisme commun aux protéines bilobaires de la classe α-β : l'agoniste se lie d'abord au lobe I, puis stabilise la fermeture du lobe 2 (Hansen et al., 2007 ; voir aussi Chapitre 2 pour les détails de ce

mécanisme sur les protéines de la famille LIVBP). Dans les récepteurs kainate, des contacts entre les lobes I et II renforcent encore plus la stabilité de la forme fermée des ABDs (Mayer, 2005). La fermeture des ABDs a pour conséquence d'augmenter la distance entre les segments reliant les ABDs aux domaines transmembranaires (FIGURE 1.12). On pense que c'est cette augmentation de distance qui provoque l'ouverture du canal en "tirant" sur les segments transmembranaires (en particulier sur les hélices M2 ; Sobolevsky et al., 2009). En accord avec ce mécanisme, Blanke and VanDongen (2008) ont montré, chez les récepteurs NMDA, que la stabilisation par ponts disulfures de l'état fermé des ABDs des sous-unités GluN1 et GluN2A rend ces récepteurs constitutivement actifs. Au contraire, les antagonistes des iGluRs stabilisent une forme ouverte des ABDs en empêchant la rotation des lobes II (Armstrong and Gouaux, 2000; Furukawa and Gouaux, 2003).

La fermeture des ABDs entraîne une déstabilisation de l'interface de dimérisation et des segments transmembranaires (Jin et al., 2003; Hansen et al., 2007). Pour relâcher cette contrainte, deux mécanismes sont possibles. Tout d'abord, les ABDs peuvent se ré-ouvrir, entraînant la fermeture du canal ionique et la dissociation des agonistes liés. C'est le phénomène de désactivation (FIGURE 1.12). Le retour à la stabilité du dimère peut aussi être obtenu par réarrangement de l'interface de dimérisation des ABDs. Ce réarrangement conduit à la désensiblisation des récepteurs en permettant aux hélices transmembranaires de revenir à leur position de repos, c'est-à-dire dans l'état fermé (Sun et al., 2002; Armstrong et al., 2006). Le passage de l'état actif à l'état désensibilisé est provoqué par une rupture de l'interface de dimérisation entre ABDs, qui se traduit par un écartement des lobes I, le degré de fermeture de ces derniers restant inchangé (Armstrong et al., 2006). Ce changement conformationnel induit un rapprochement des liens ABDs-domaines transmembranaires qui permet au canal de se refermer (FIGURE 1.12). En première approximation, on peut considérer que les iGluRs oscillent en permenanence entre les trois états décrits dans la FIGURE 1.12 : au repos, actif et désensibilisé. Ce schéma général du mode de fonctionnement des iGluRs, permet alors d'expliquer les mécanismes d'action des agonistes

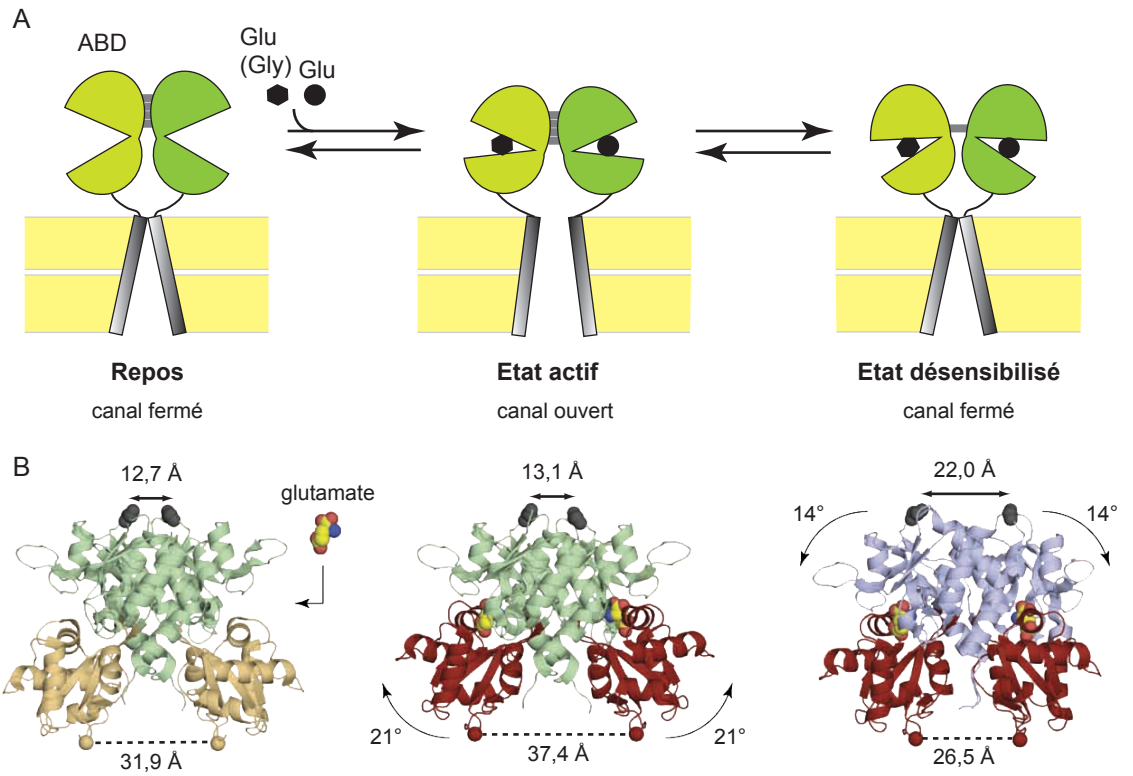


FIGURE 1.12 – Mécanismes d'activation et de désensibilisation des iGluRs. A, Représentation schématique des mécanismes d'activation et de désensibilisation des iGluRs. Les NTDs n'ont pas été représentés. B, Représentation sous forme de rubans des dimères d'ABDs des sous-unités GluA2 dans l'état apo (non ligandé, pdb : 1fto), dans l'état actif (lié au glutamate, pdb : 1ftj) et dans l'état désensibilisé (lié au glutamate, pdb : 2i3v). Les lobes I sont colorés en vert lorsque l'interface de dimérisation est dans l'état "actif" et en bleu lorsque cette dernière est dans l'état "désensibilisé". Les lobes II sont colorés en orange dans la forme apo et en rouge dans les formes liées au glutamate. Les distances mesurées sont les distances entre les liens vers le domaine transmembranaire (boules colorées) et entre deux glycines (G739) situées au sommet des lobes I (représentées en CPK et en noir). La partie B a été adaptée de l'article de Hansen et al. (2007).

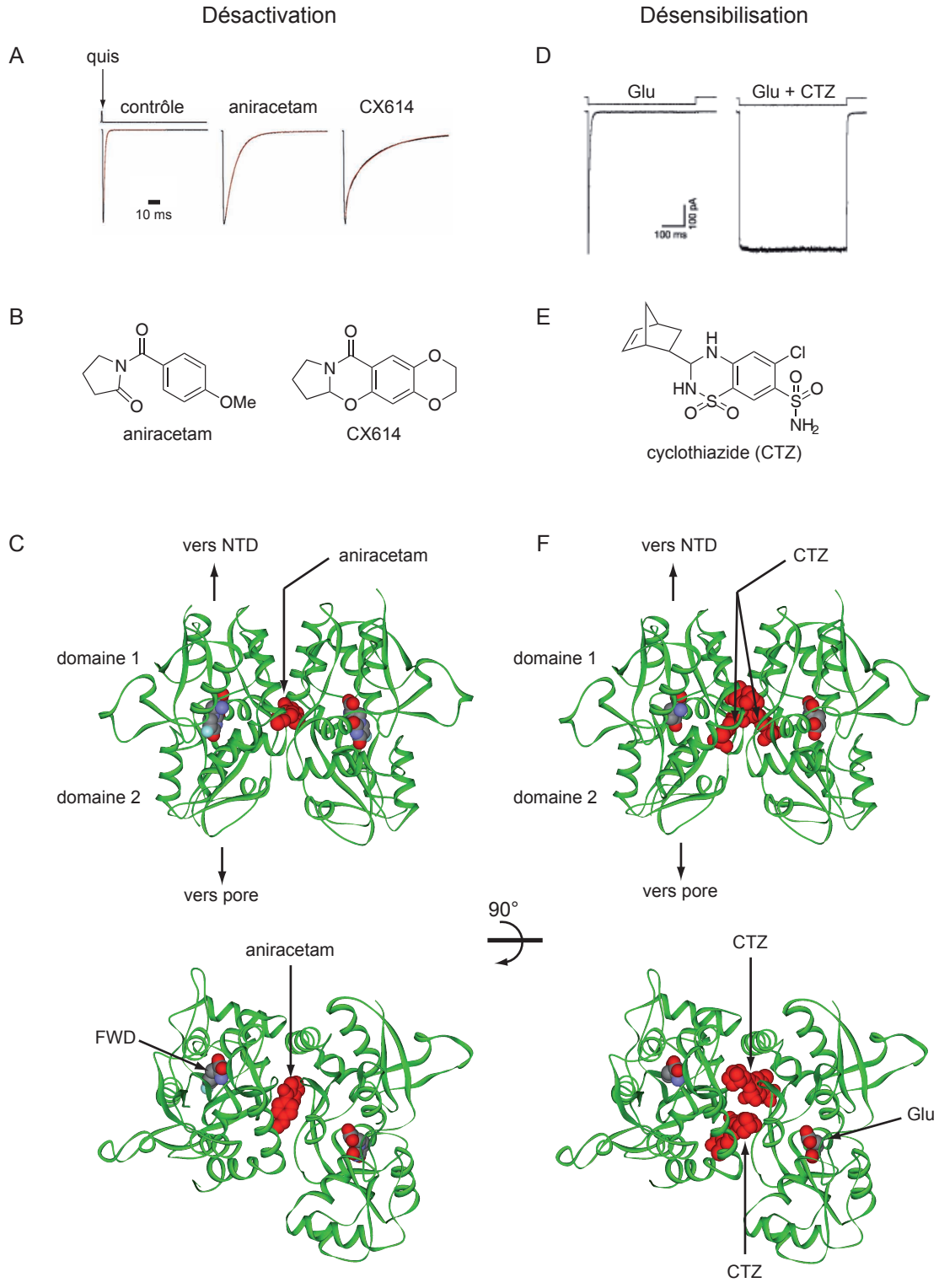
partiels, de certains modulateurs allostériques positifs ainsi que les différences d'activité entre les récepteurs AMPA, kainate et NMDA.

Les agonistes partiels sont des ligands qui, appliqués à concentration saturante sur les récepteurs, ne produisent pas une réponse maximale. Chez les récepteurs AMPA et kainate, les différentes structures obtenues en présence de divers agonistes complets et partiels a démontré que l'efficacité d'un agoniste est directement proportionnelle au degré de fermeture des ABDs (Armstrong and Gouaux, 2000; Jin et al., 2003; Mayer, 2005). Les agonistes partiels induisent une fermeture plus faible des ABDs, d'où un écartement plus faible entre les lobes II. Ce changement conformationnel se traduit par le fait que les récepteurs activés par des agonistes partiels passent plus de temps dans des états de faible conductance que ceux activés par des agonistes complets (Jin et al., 2003). L'origine de la différence d'efficacité entre agonistes est différente chez les récepteurs NMDA. En effet, des structures cristallographiques obtenues pour la sous-unité GluN1 en présence d'ACPC (acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique) et d'ACBC (acide 1-aminocyclobutane-1-carboxylique), deux agonistes partiels activant les récepteurs NMDA avec des efficacités de 80 % et 42 %, respectivement, montrent que les degrés de fermetures des ABDs sont identiques à la fermeture obtenue en présence de glycine, un agoniste complet (Inanobe et al., 2005). En dépit d'un degré de fermeture similaire, les ABDs ont cependant des conformations différentes en fonction du type d'agoniste lié, notamment au niveau de leur charnière. Ainsi, dans le cas des récepteurs NMDA, l'efficacité non maximale de certains agonistes serait due à une "mauvaise" stabilisation de la forme fermée des ABDs qui, en conséquence, aboutirait à une stabilisation moindre de la forme active des récepteurs NMDA (Inanobe et al., 2005).

Les récepteurs AMPA et kainate sont caractérisés par des cinétiques de désactivation et de désensibilisation très rapides (Figure 1.13A). Selon le schéma d'activation que nous avons décrit en Figure 1.12, le phénomène de désactivation est relié en partie à la stabilité de la conformation fermée des ABDs. Il existe des modulateurs allostériques positifs, tels

que l'aniracetam ou CX614, qui augmentent l'activité des récepteurs AMPA en diminuant leur vitesse de désactivation. Ces molécules se lient dans l'interface de dimérisation des ABDs, au niveau des charnières des deux domaines, et stabilisent la forme fermée des ABDs (Jin et al., 2005 ; FIGURE 1.13C). Les récepteurs NMDA ont par contre des cinétiques lentes de désactivation. De façon intéressante, l'ABD de la sous-unité GluN1 possède, au niveau de sa charnière, une tyrosine, Y535, qui contacte la charnière de la sous-unité GluN2A adjacente (Furukawa et al., 2005). Cette tyrosine semble jouer le même rôle que l'aniracetam chez les récepteurs AMPA, ce qui expliquerait en partie les cinétiques de désactivation lentes chez les récepteurs NMDA.

Chez les récepteurs AMPA et kainate, les cinétiques et l'amplitude de désensibilisation sont reliées en grande partie à la stabilité de l'interface de dimérisation entre ABDs. En accord avec cette observation, des expériences d'ultracentrifugation ont montré, chez les récepteurs AMPA et kainate, que la vitesse de désensibilisation est inversement corrélée à la stabilité de l'interface de dimérisation entre ABDs (Sun et al., 2002; Chaudhry et al., 2009b). De plus, en maintenant par des ponts disulfures l'interface de dimérisation dans sont état "actif", Weston et al. (2006) ont réussi à générer des récepteurs AMPA GluA2 et kainate GluK1, GluK2 et GluK3 qui ne désensibilisent pas. Chez les récepteurs AMPA, la désensibilisation peut-être supprimée grâce à des modulateurs allostériques positifs tels que le cyclothiazide (FIGURE 1.13D). Ces molécules se fixent à l'interface de dimérisation entre ABDs, à un site différent de celui des modulateurs contrôlant la désactivation, et empêchent la rupture de cette interface (Sun et al., 2002 ; FIGURE 1.13F). Les récepteurs NMDA, en revanche, ne présentent pas de désensibilisation rapide telle qu'on la connaît chez les récepteurs AMPA. Cependant, le réarrangement de l'interface de dimérisation entre ABDs qui a été observé dans les états désensibilisés des récepteurs AMPA et kainate semble aussi exister chez les récepteurs NMDA lors de l'inhibition allostérique (Gielen et al., 2008). Le mécanisme de réarrangement de l'interface de dimérisation entre ABDs fait intervenir les domaines N-terminaux (voir ci-dessous).


Désactivation
Désensibilisation
A
quis
contrôle
aniracetam
CX614
10 ms
D
Glu
Glu + CTZ
100 pA
100 ms
B
OMe
aniracetam
CX614
E
Cl
HN
NH2
cyclothiazide (CTZ)
C
vers NTD
aniracetam
domaine 1
domaine 2
vers pore
F
vers NTD
CTZ
domaine 1
domaine 2
vers pore
90°
aniracetam
FWD
CTZ
Glu
CTZ

1.3.2 Le rôle des domaines N-terminaux dans le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA

Les domaines N-terminaux de certaines sous-unités GluN2 des récepteurs NMDA sont capables de lier des modulateurs allostériques négatifs. Ainsi, les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B sont capables de lier l'ion Zn^{2+} (Low et al., 2000; Fayyazuddin et al., 2000; Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005). Le NTD de GluN2B lie en plus l'ifenprodil, une molécule organique de synthèse (Perin-Dureau et al., 2002). La liaison des ces molécules sur le NTD de la sous-unité GluN2 provoque l'inhibition des récepteurs NMDA. Comment la liaison de molécules à un domaine distant permet-elle la fermeture du canal ionique ? Des expériences de mutagénèse dirigée réalisée sur les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B indiquent que le zinc et l'ifenprodil se lient dans la crevasse interlobaire du NTD de la sous-unité GluN2 et provoquent sa fermeture (Paoletti et al., 2000; Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005). Gielen et al. (2008) ont montré, sur les récepteurs GluN1/GluN2A, que la déstabilisation de l'interface de dimérisation entre les ABDs de GluN1 et GluN2A entraîne une augmentation de la sensibilité de ces récepteurs pour le zinc. Au contraire, la stabilisation par ponts disulfure de cette interface diminue for-

FIGURE 1.13 – Les modulations allostériques positives chez les récepteurs AMPA. A, L'aniracétam et CX614 diminuent la vitesse de désactivation des récepteurs AMPA. Traces d'électrophysiologie obtenues pour les récepteurs homomériques GluA2 (flop) surexprimés en cellules HEK293. Les récepteurs AMPA ont été activés par une application brève (1ms) de 3mM de quisqualate sans modulateur (contrôle) ou en présence de 5 mM d'aniracetam ou de 100 μM de CX614. D'après Jin et al. (2005). B, Structures chimiques de l'aniracetam et de CX614. C, Structure cristallographique d'un dimère d'ABD GluA2 en présence d'aniracetam et de fluorowillardiine (FWD, agoniste compétitif du glutamate) (pbd : 2al5). Les ABDs sont représentés en vert sous forme de rubans. L'aniracetam et la fluorowillardiine sont représentés sous forme CPK et colorés selon les couleurs conventionnelles (voir Annexe) pour la fluorowillardiine et en rouge pour l'aniracetam. D, Le cyclothazide (CTZ) supprime la désensibilisation des récepteurs AMPA. Traces d'électrophysiologie obtenues pour des récepteurs homomériques GluA2 (flip) exprimés en cellules HEK293. Les récepteurs sont activés par une application prolongée de glutamate (Glu ; 3mM) en présence ou non de 30 μM de cyclothiazide. D'après Sun et al. (2002). E, Structure chimique du cyclothiazide. F, Structure cristallographique d'un dimère d'ABD GluA2 en présence de cyclothiazide et de glutamate (pbd : 1lbc). Les conventions de représentation sont les mêmes qu'en C, le cyclothiazide étant coloré en rouge.

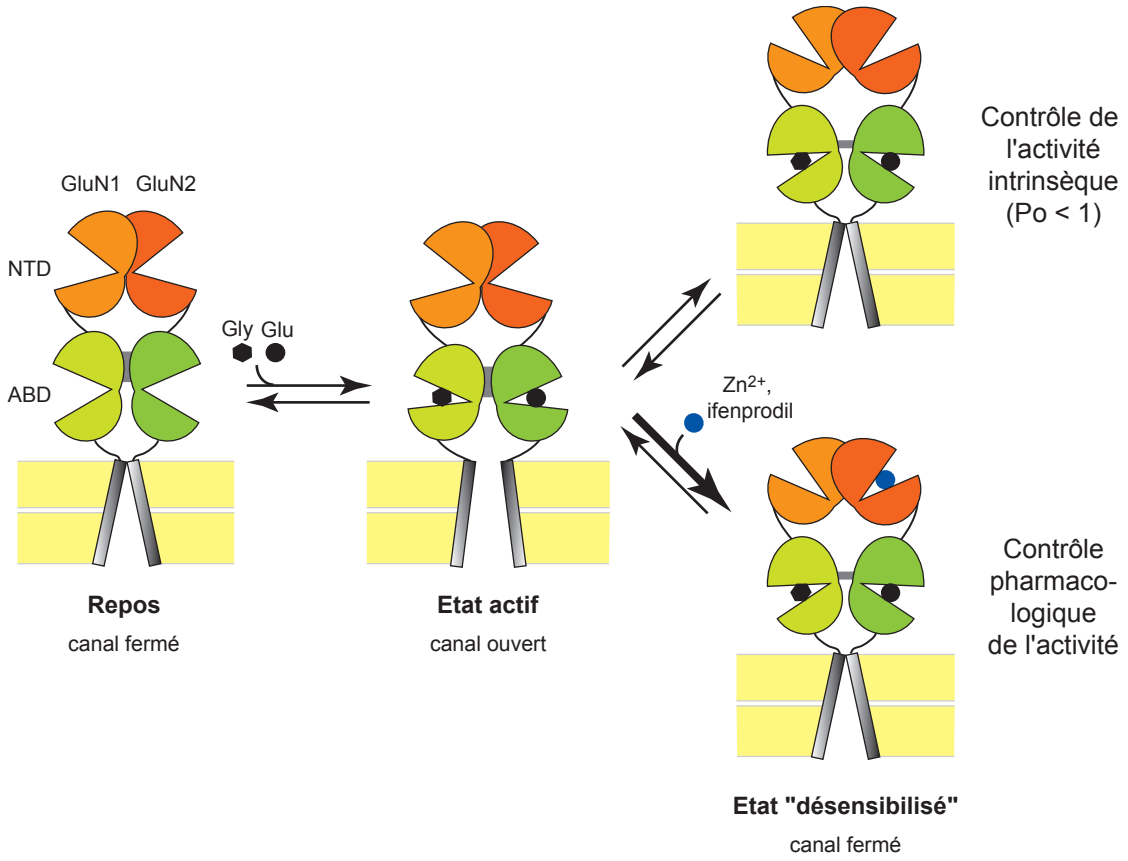


FIGURE 1.14 – Représentation schématique du mécanisme de modulation de l'activité des récepteurs NMDA par le NTD de la sous-unité GluN2. Nous avons représenté le NTD de la sous-unité GluN1 comme le symétrique du NTD de GluN2, même si nous ne savons pas s'il subit les mêmes changements conformationnels. De même, nous avons représenté un hétérodimère de NTDs GluN1/GluN2, même si cet arrangement n'a pas été démontré (voir Section 1.2.2). D'après les mécanismes proposés dans Gielen et al. (2008, 2009)

tement la sensibilité des récepteurs GluN1/GluN2A pour le zinc. Enfin, ils ont montré que le zinc augmente l'accessibilité de cystéines introduites dans l'interface de dimérisation. Ces données, combinées à ce qui a été décrit sur le mécanisme de désensibilisation des récepteurs AMPA et kainate, indiquent que, sous l'action du zinc, la fermeture du NTD de la sous-unité GluN2A provoque la rupture de l'interface de dimérisation entre ABDs. On peut donc proposer que les récepteurs NMDA existent sous un état "inhibé" qui ressemble à l'état désensibilisé des récepteurs AMPA et kainate. Le mécanisme proposé d'inhibition des récepteurs NMDA par les modulateurs allostériques est représenté en FIGURE 1.14. Ce mécanisme, qui a été démontré pour les récepteurs GluN1/GluN2A, reste cependant à démontrer pour les récepteurs NMDA contenant d'autres sous-unités GluN2, et notamment pour la modulation des récepteurs GluN1/GluN2B par l'ifenprodil et par le zinc.

Plus récemment, il a été démontré que, même en l'absence d'antagonistes tels que le zinc ou l'ifenprodil, le NTD de la sous-unité GluN2 contrôle l'activité des récepteurs NMDA. En présence de concentrations saturantes de glutamate et de glycine, l'activité des récepteurs NMDA n'est pas maximale. En effet, les récepteurs NMDA ont une probabilité d'ouverture qui dépend de la sous-unité GluN2 incorporée (voir Section 1.2.1). Les travaux de Gielen et al. (2009) et Yuan et al. (2009) ont montré que échanger les NTDs ainsi que le lien NTD-ABD entre les sous-unités GluN2A et GluN2B, et GluN2A et GluN2D, permet d'échanger en grande partie les probabilités d'ouverture des récepteurs. De plus, Gielen et al. (2009) ont montré, sur les récepteurs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B, que des cystéines situées dans la charnière des NTDs de GluN2A et GluN2B sont accessibles lorsque les récepteurs NMDA sont actifs, et que la modification de ces cystéines par des substituants encombrants, qui stabilisent l'état ouvert du NTD, induit une augmentation de la probabilité d'ouverture des récepteurs. Ceci suggère donc que le NTD de la sous-unité GluN2 est capable d'osciller spontanément entre un état ouvert et un état fermé (mécanisme général aux protéines de la famille LIVBP, voir Chapitre 2) et que c'est cette oscillation qui contrôle en partie la probabilité d'ouverture des récepteurs NMDA. Ces

résultats, combinés au mécanisme proposé pour la modulation allostérique des récepteurs NMDA par le zinc, permettent de proposer un mécanisme de fonctionnement général des récepteurs NMDA (Figure 1.14). La liaison du glutamate et de la glycine induit l'entrée des récepteurs NMDA dans un état actif, caractérisé par une interface de dimérisation entre ABDs intacte et des NTDs en conformation ouverte. La fermeture du domaine N-terminal de GluN2, spontanée ou induite par un ligand, provoque l'entrée des récepteurs NMDA dans un état de type "désensibilisé", où l'interface de dimérisation entre ABDs est rompue. On peut alors interpréter l'activité non maximale des récepteurs NMDA par le fait que, en présence de concentrations saturantes d'agonistes, les récepteurs oscillent spontanément entre l'état actif et l'état désensibilisé. Cette hypothèse est renforcée par le fait que des cystéines introduites dans l'interface de dimérisation entre ABDs sont accessibles lorsque les récepteurs GluN1/GluN2A sont activés (en l'absence de zinc), suggérant qu'une proportion des récepteurs est dans un état où l'interface entre ABDs est rompue (Gielen et al., 2008). Les différences de probabilités d'ouverture entre récepteurs NMDA comportant différentes sous-unités GluN2 sont alors dues à des différences de constantes d'équilibre entre état actif et état "désensibilisé". D'après l'article de Gielen et al. (2009), cette constante d'équilibre est en partie contrôlée par le NTD de la sous-unité GluN2 selon deux paramètres :

- la stabilité plus ou moins grande du NTD dans les formes fermée et ouverte ;
- l'efficacité du couplage entre NTD et ABD qui est déterminée par les segments reliant les deux domaines. En effet, les segments NTD-ABD se sont révélés être des éléments clés dans le contrôle de la probabilité d'ouverture.

En accord avec ce mécanisme, le zinc et l'ifenprodil, qui stabilisent une forme fermée du NTD de GluN2, déplacent l'équilibre vers la forme "désensibilisée", entraînant l'inhibition des récepteurs NMDA. On pourrait imaginer à l'inverse que des molécules stabilisant la forme ouverte des NTDs agissent comme des modulateurs allostériques positifs des récepteurs NMDA (Gielen et al., 2009).

Ce mécanisme présente cependant de nombreuses inconnues. En effet, en absence de récepteurs NMDA fonctionnels contenant des sous-unités GluN1 sans NTD, nous ne connaissons pas le rôle de la sous-unité GluN1 dans le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA. Nous ne savons notamment pas si le NTD de GluN1 subit les mêmes changements conformationnels que celui de GluN2 (voir discussion de l'article IV). En outre, sur le mécanisme présenté en FIGURE 1.14, nous avons supposé que les NTDs forment des hétérodimères GluN1/GluN2. C'est l'organisation qui a été proposée par Sobolevsky et al. (2009), mais cette organisation reste à démontrer formellement.

Si les récepteurs NMDA peuvent adopter une conformation de type "désensibilisée", pourquoi n'observe-t-on pas de désensibilisation chez ces récepteurs ? Les récepteurs AMPA et kainate ont des cinétiques d'activation et de désensibilisation du même ordre de grandeur, ce qui fait qu'on peut observer les deux phénomènes. Il est possible que, chez les récepteurs NMDA, le processus de désensibilisation existe, mais qu'il soit très rapide par rapport au processus d'activation. Ceci a pour conséquence que l'établissement de l'équilibre entre états actif et désensibilisé précède l'activation des récepteurs. Si cette hypothèse est vraie, il devrait être possible de séparer les deux phénomènes, soit en augmentant la vitesse d'activation des récepteurs, soit en diminuant leur vitesse de désensibilisation par le biais d'une stabilisation de l'interface de dimérisation entre ABDs.

Dans cette partie, nous avons vu que les iGluRs sont des récepteurs possédant des structures et des fonctions variées. Ces récepteurs ont une organisation modulaire, et les changements conformationnels de ces différents modules sont à l'origine de l'activité de ces récepteurs. Le coeur de l'activation se situe au niveau des ABDs et des segments transmembranaires. Cependant, bien que les NTDs des récepteurs AMPA et kainate ne semblent pas avoir de rôle majeur dans le contrôle de l'activité en tant que tel, les NTDs des récepteurs NMDA, particulièrement ceux des sous-unités GluN2, jouent un rôle très important dans le contrôle de l'activité de ces récepteurs. Ils constituent en effet le site de

liaison de modulateurs allostériques négatifs et participent au contrôle des différences de probabilité d'ouverture entre les différents sous-types de récepteurs NMDA. Nous avons vu que les NTDs des iGluRs partagent une similarité de structure avec la protéine bactérienne périplasmique LIVBP, ainsi qu'avec le domaine "Venus flytrap" des mGluRs. Ces protéines bilobaires présentent de nombreux principes communs en matière de structure, liaison de ligands et changements conformationnels. Il est donc intéressant d'étudier les propriétés des protéines de la famille LIVBP afin de mieux comprendre les propriétés des NTDs des récepteurs NMDA.

Chapitre 2

La famille des protéines apparentées à LIVBP : repliement, mode de fonctionnement et assemblage multimérique

Les protéines bactériennes périplasmiques (PBP) représentent une grande famille de protéines présentes dans le périplasme des bactéries gram négatives et impliquées dans le transport de petites molécules telles que les acides aminés, les sucres, les ions ou les peptides. Après avoir fixé leur ligand, elles sont prises en charge par des transporteurs localisés dans la membrane interne de la bactérie (FIGURE 2.2 ; Saier, 2000. La "leucine/isoleucine/valine-binding protein" (LIVBP), impliquée dans la reconnaissance des acides aminés hydrophobes, est une des premières PBP à avoir été cristallisée (Sack et al., 1989). Cette protéine est la représentante d'une famille de protéines partageant une organisation structurale commune. D'après la classification SCOP (structural classification of proteins), LIVBP fait partie de la classe des protéines α-β car elle présente une alternance d'hélices α et de brins β (voir alignement en Annexe et FIGURE 2.1). Du point de vue de leur arrangement tertiaire, les protéines de la classe α-β apparentées à LIVBP sont toutes composées de deux structures globulaires, appelées lobes, composées d'un feuillet β central hydrophobe flanqué d'hélices α amphiphiles, et reliées par trois

segments charnière (Quiocho and Ledvina, 1996). La plupart de ces protéines capturent leurs ligands dans l'espace situé entre leurs deux lobes (FIGURE 2.2), ce qui leur a valu le nom de "clamshell-like proteins" ou de "venus-flytrap proteins", par comparaison avec la Dionée, une plante carnivore composée de deux lobes se refermant sur leur proie. LIVBP fait partie de la famille des protéines bactériennes périplasmiques de type I, que nous appellerons dans la suite de notre exposé "famille LIVBP". Notons qu'il existe une famille de type II, que nous ne détaillerons pas. Les protéines de la famille de type II présentent une structure bilobaire similaire à celles de la famille de type I, mais le repliement de leurs structures secondaires est différent. Elles présentent cependant de nombreuses propriétés similaires aux protéines périplasmiques de type I. Dans cette famille on trouve notamment la "lysine/arginine/ornithine-binding protein" (LAOBP) et les domaines de liaison des agonistes des iGluRs (Sternbach et al., 1994 et voir Section 1.2.2).

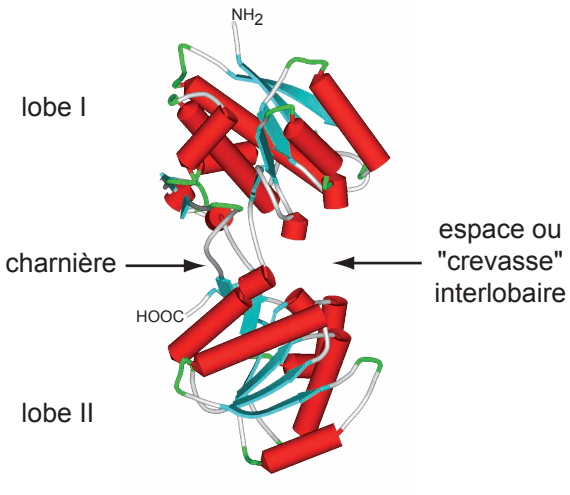


FIGURE 2.1 – Structure tridimensionnelle de LIVBP en configuration ouverte (pdb : 2liv). Les hélices α sont représentées par des cylindres rouges et les brins β par des flèches turquoise. Les boucles sont représentées en blanc et vert.

Outre les nombreuses PBP présentant le même repliement que LIVBP (voir alignement), des recherches par similarité de séquences, ainsi que des études de modélisation et de cristallographie aux rayons X ont montré que l'arrangement structural caractéristique des protéines de la famille LIVBP est aussi retrouvé dans un certain nombre de classes de

récepteurs ayant des rôles biologiques variés (FIGURE 2.2). Les récepteurs contenant des domaines de type LIVBP sont principalement impliqués dans les processus de signalisation cellulaire. Font ainsi partie de la famille LIVBP :

- le domaine de liaison des agonistes de la famille 3 des RCPG (O'Hara et al., 1993; Kunishima et al., 2000), comprenant les mGluRs, les récepteurs $GABA_B$, le senseur calcique, certains récepteurs du goût et certains récepteurs aux phéromones (Pin et al., 2003),
- le domaine extracellulaire des récepteurs au peptide atrial natriurétique (ANPR). Ces récepteurs, couplés à une guanylyl cyclase, sont impliqués dans la régulation de l'homéostasie cardiovasculaire et de la pression sanguine (He et al., 2001).
- le domaine extracellulaire de certains récepteurs couplés à une tyrosine kinase, comme la famille des VKR ("venus kinase receptors") présente chez les Invertébrés (Vicogne et al., 2003; Ahier et al., 2009),
- le domaine N-terminal des récepteurs ionotropiques du glutamate (O'Hara et al., 1993; Paoletti et al., 2000) qui joue un rôle dans l'assemblage et la modulation de ces récepteurs.

Les protéines de la famille LIVBP ont été largement étudiées, et l'ensemble des données structurales et fonctionnelles nous indiquent que, malgré une grande divergence dans leur séquences primaires (l'identité de séquence entre deux protéines peut être inférieure à 15 % dans certains cas), ces protéines possèdent des principes communs concernant le mode de liaison de leur ligands, leurs changements conformationnels et leur mode d'association. Dans la suite de ce chapitre, nous allons nous attacher à décrire ces différentes propriétés.

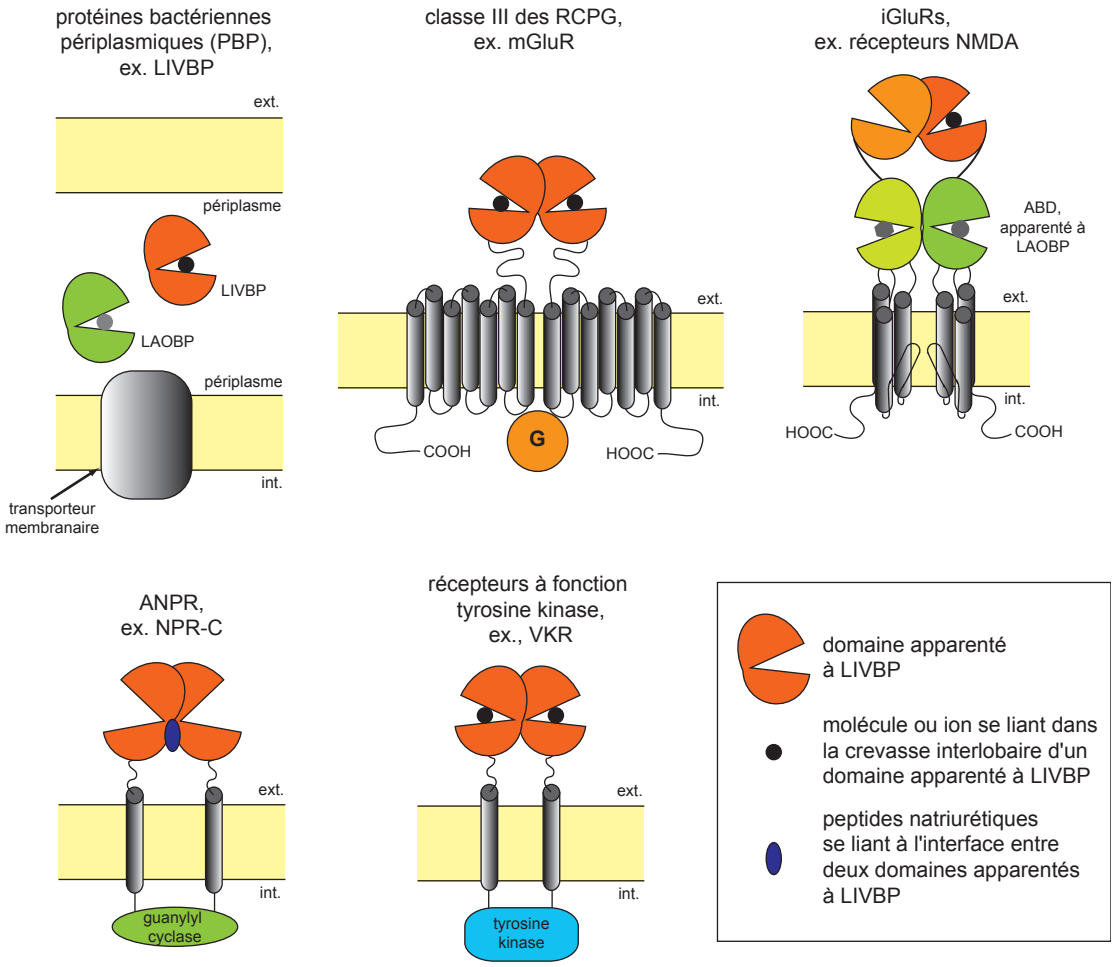


FIGURE 2.2 – Représentation schématique des grandes familles de récepteurs comportant des domaines apparentés à LIVBP. int., milieu intracellulaire ; ext., milieu extracellulaire ; ABD, “agonist-binding domain” ; LAOBP, “lysine/arginine/ornithine binding protein” ; ANPR, “atrial natriuretic peptide receptor” ; VKR, “venus kinase receptor”. Les agonistes des iGluRs, glutamate (et glycine pour les récepteur NMDA) sont représentés par un hexagone et un rond gris.

2.1 Dynamique structurale des domaines isolés de la famille LIVBP

2.1.1 Les protéines de la famille LIVBP adoptent deux états conformationnels

De nombreuses expériences de cristallographie ont été réalisées sur les domaines de la famille LIVBP et ont mis en évidence la présence de différents conformères de ces domaines. Les différentes structures cristallographiques obtenues à partir de LIVBP (Sack et al., 1989; Trakhanov et al., 2005) ou du domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$ (Kunishima et al., 2000) en sont des bons exemples. La FIGURE 2.3 montre ainsi que les domaines de type LIVBP existent sous deux conformations limites : un état ouvert, dans lequel les deux lobes sont éloignés l'un de l'autre, et un état fermé, dans lequel les deux lobes sont en contact. Si l'on regarde la superposition des différents conformères de LIVBP (FIGURE 2.3A), on voit que les lobes I de LIVBP sont parfaitement superposables (RMS = 0.40 Å). Il en est de même si l'on superpose les lobes II (RMS = 0.52 Å). Le passage de l'état ouvert à l'état fermé de la protéine se fait en effet par rotation rigide d'un lobe vers l'autre grâce à la torsion des résidus de la charnière (Magnusson et al., 2004; Trakhanov et al., 2005). Dans le cas de LIVBP, le rapprochement des deux lobes se fait selon un angle de 60° (Trakhanov et al., 2005) si l'on part de la forme "superouverte" (voir FIGURE 2.3A), alors que dans $mGlu_1$, l'angle de fermeture n'est que de 31° (Kunishima et al., 2000). La variabilité de différences d'angles entre les formes fermée et ouverte est probablement dû aux contraintes cristallographiques qui imposent différents degrés d'ouvertures aux formes ouvertes (Trakhanov et al., 2005). Ce type de mouvement de fermeture, appelé "rigid body hinge-bending motion", n'est pas spécifique aux protéines de la famille LIVBP. Il est en effet retrouvé dans de nombreuses protéines comportant deux domaines rigides séparés par un ou plusieurs segments flexibles (Gerstein et al., 1994).

En absence de ligand, les protéines de la famille LIVBP sont le plus souvent en confor-

mation ouverte, alors qu'elles sont le plus souvent fermées en présence de ligand. Ces observations indiquent que le ligand stabilise la forme fermée de la protéine, soit en induisant des changements conformationnels qui permettent la fermeture de la protéine (mécanisme d"'induced fit"), soit en stabilisant un équilibre ouvert-fermé pré-établi (comme proposé par Sack et al., 1989). le fait qu'on aie pu cristalliser le VFD de $mGlu_1$ dans des formes fermée et ouverte en l'absence de ligand laisse penser que ce domaine peut osciller spontanément entre une forme ouverte et une forme fermée (FIGURE 2.3A). Ces conclusions, énoncées à partir des différentes "photographies" des états conformationnels des domaines de la famille LIVBP, ont été confirmées par des expériences dynamiques et fonctionnelles. Ainsi, des expériences utilisant la technique de "small angle X-ray scattering" (SAXS) ont montré, sur la "L-arabinose-binding protein", que la liaison du ligand favorisait l'état fermé de la protéine (Newcomer et al., 1981). Ce résultat a aussi été confirmé par des expériences de mutagénèse dirigée qui montrent que le ligand interagit avec des résidus des lobes I et II (voir, par exemple Galvez et al. (2000) pour le baclofen dans les récepteurs $GABA_B$ ou Paoletti et al. (2000) pour le zinc dans le domaine N-terminal de la sous-unité GluN2A des récepteurs NMDA). De plus, il a été montré que le couplage par un pont disulfure des lobes I et II du domaine LIVBP des récepteurs $GABA_B$ rendait ces récepteurs constitutivement actifs, mimant ainsi l'effet du GABA (Kniazeff et al., 2004b). Cette expérience confirme ainsi que, chez les récepteurs $GABA_B$, c'est la fermeture d'un domaine LIVBP induit par le GABA qui provoque l'activation de ces récepteurs.

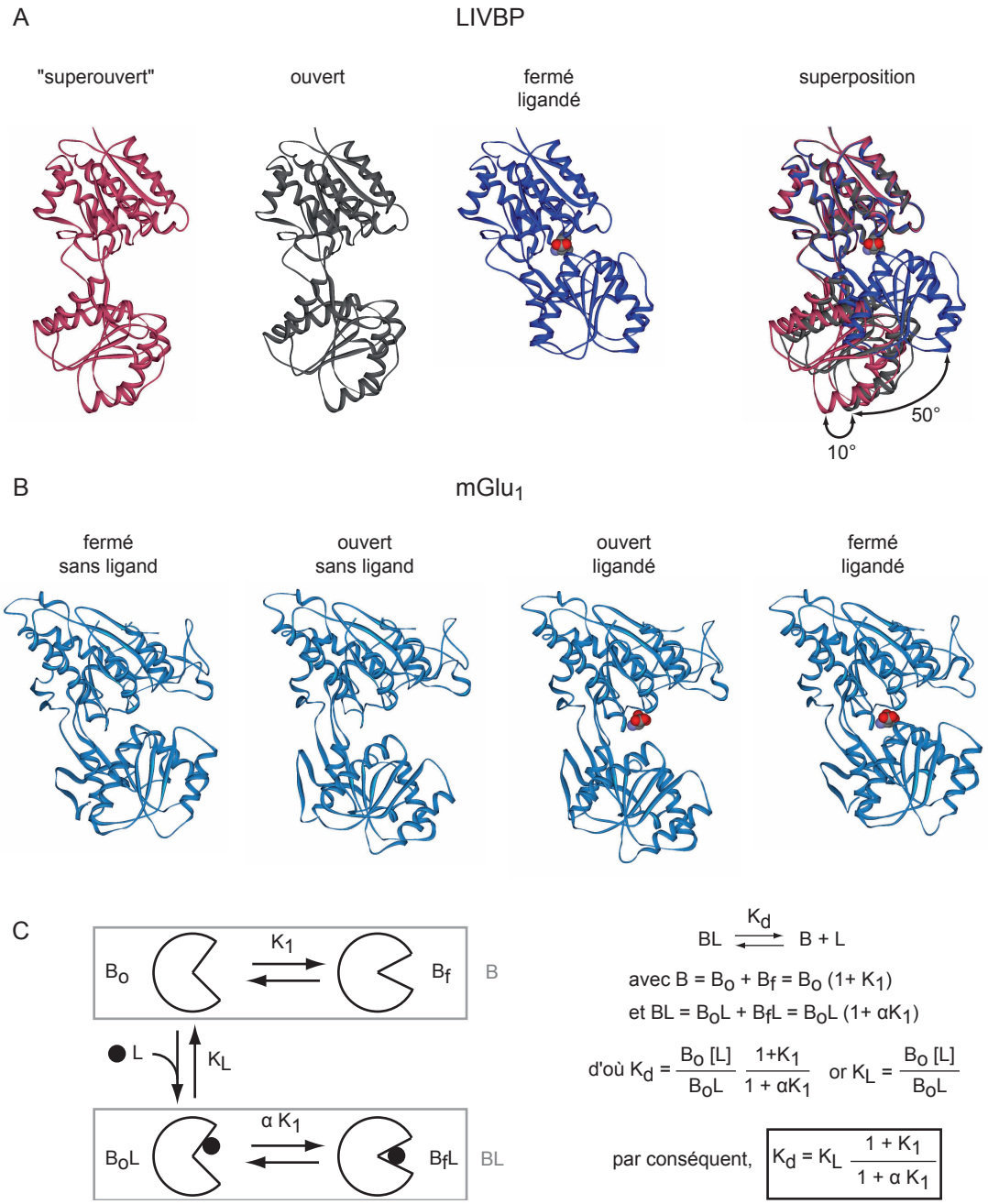
En outre, des expériences fonctionnelles ont montré que certains domaines de types LIVBP peuvent osciller spontanément entre un état ouvert et un état fermé. L' activité constitutive observée sur les récepteurs $GABA_B$ sauvages, qui peut être inhibée par des antagonistes compétitifs du GABA (qui maintiennent le domaine LIVBP ouvert) a été en effet attribuée à des oscillations spontanées en l'absence de ligand (Kniazeff et al., 2004b). Des oscillations spontanées ont aussi été mises en évidence pour les NTDs des récepteurs NMDA, oscillations qui seraient responsables de la probabilité inférieure à 1 de

ces récepteurs (Gielen et al., 2009 et voir Chapitre 1, Section 1.3.2).

Pour les domaines oscillant spontanément entre un état fermé et un état ouvert, le schéma thermodynamique permettant d'expliquer l'affinité apparente d'un ligand est décrit en FIGURE 2.3C. Un domaine oscille entre un état ouvert et un état fermé avec la constante d'équilibre K_1. Le ligand se lie à la forme ouverte du domaine avec la constante de dissociation K_L et modifie la constante d'équilibre ouvert-fermé du domaine en αK_1, avec $\alpha > 1$ pour un agoniste et $0 < \alpha < 1$ pour un antagoniste (Parmentier et al., 2002). La constante de dissociation apparente du ligand sera alors définie par :

$$K_d = K_L \frac{1+K_1}{1+\alpha K_1}$$

Ce modèle nous indique que l'affinité apparente d'un ligand ne dépend pas uniquement des contacts que peut faire ce ligand avec la protéine (K_L et α), mais aussi de la constante d'équilibre entre les états ouvert et fermé de la protéine en absence de ligand (K_1). Ainsi, Vermersch et al. (1990) ont observé, chez la "L-arabinose-binding protein", que la mutation en glycine de la proline 254, située dans la charnière, augmentait d'un facteur 20 l'affinité pour le D-galactose. Cette mutation modifie peu le site de liaison du D-galactose mais augmente la stabilité de l'état fermé de la protéine (c'est-à-dire K_1), diminuant par la même occasion la constante apparente de dissociation K_d du D-galactose. On peut interpréter de la même façon, chez les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A, l'augmentation d'affinité pour le zinc induite par la mutation en alanine de la tyrosine 281, située dans la charnière du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2A (Paoletti et al., 2000). Enfin, sur la "maltose-binding protein", une protéine périplasmique de type II existant aussi sous deux conformations fermée et ouverte, Marvin and Hellinga (2001), en substituant une isoleucine située à l'arrière de la charnière de la protéine par des composés de tailles différentes, ont pu moduler l'affinité apparente du maltose selon une gamme de constantes de dissociations allant de $7,4\,\text{nM}$ à $1,8\,\text{mM}$.


A
LIVBP
"superouvert"
ouvert
fermé
ligandé
superposition
50°
10°
B
mGlu1
fermé
sans ligand
ouvert
sans ligand
ouvert
ligandé
fermé
ligandé
C
Bo
K1
Bf
B
L
KL
BoL
α K1
BfL
BL
BL Kd B + L
avec B = Bo + Bf = Bo (1+ K1)
et BL = BoL + BfL = BoL (1+ αK1)
d'où Kd = Bo [L] / BoL · 1+K1 / 1 + αK1 or KL = Bo [L] / BoL
par conséquent, Kd = KL · 1 + K1 / 1 + α K1

2.1.2 Bases moléculaires de l'affinité et de la sélectivité pour les ligands

Fixation séquentielle des ligands des protéines de la famille LIVBP

Bien que les protéines de la famille LIVBP aient des séquences primaires éloignées ($< 15\,\%$ pour certaines protéines), leurs ligands, eux aussi très divers (acides aminés, sucres, ions, peptides, petites molécules organiques...) présentent des modes de liaison similaires. À part pour quelques exceptions (voir Section 2.2.3), les ligands se lient tous à l'intérieur de la fente interlobaire des protéines de type LIVBP (Quiocho and Ledvina, 1996; Pin et al., 2003). De plus, les différentes structures cristallographiques des protéines de type LIVBP ont montré que le ligand pouvait être présent à la fois dans la configuration ouverte et dans la configuration fermée de la protéine (voir FIGURE 2.3A et B). En effet, la liaison d'un ligand à une protéine de la famille LIVBP se fait en deux étapes (Sack et al., 1989; Kunishima et al., 2000; Trakhanov et al., 2005) : tout d'abord, le ligand se fixe exclusivement au lobe I de la protéine en conformation ouverte, puis il établit des contacts avec le lobe II, soit en induisant des changements conformationnels qui permettent la fermeture de la protéine ("induced fit"), soit en stabilisant un équilibre ouvert-fermé pré-existant (voir le modèle thermodynamique dans la FIGURE 2.3C). Une fois le domaine refermé, le ligand est complètement encagé dans la protéine et devient très peu accessible au solvant. Ce mécanisme semble général aux protéines de la famille LIVBP. Nous allons

FIGURE 2.3 – Différents conformères, avec ou sans ligand, de deux protéines de la famille LIVBP : LIVBP (A) et le domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$ (B). Les protéines sont représentées sous forme de ruban et les ligands (isoleucine pour LIVBP et glutamate pour $mGlu_1$) sont représentés sous forme CPK selon les codes couleurs conventionnels(voir Annexe). A, Les structures cristallographiques de LIVBP ont révélé trois conformations : "superouvert"(car plus ouverte que la structure ouverte initialement trouvée ; pdb : 1z15), ouvert, (pdb : 2liv), et une conformation fermée ligandée (fermée, pdb 1z17 pour la forme cristallisée en présence d'isoleucine). Le panneau de droite représente la superposition des trois conformères de LIVBP. On remarque que les lobes I des différents conformères se superposent parfaitement. B, Les structures cristallographiques de $mGlu_1$ ont révélé quatre états : fermé sans ligand (pdb : 1ewv : A), ouvert sans ligand (pdb : 1ewv : B), ouvert ligandé (pdb : 1ewk : B) et fermé avec ligand (pdb : 1ewk : A). C, modèle d'équilibre dynamique de liaison du ligand selon l'état conformationnel du récepteur. D'après Parmentier et al. (2002)

le décrire plus précisément en prenant comme exemple LIVBP (en choisissant l'isoleucine comme ligand), car c'est sur cette protéine que ce mécanisme a été le plus étudié (Sack et al., 1989; Trakhanov et al., 2005).

Lorsque l'isoleucine se lie au lobe I de LIVBP, son fragment glycine (la partie α-amino acide à proprement parler) fait des liaisons hydrogène avec les chaînes latérales d'une thréonine (T102) et un sérine (S79), ainsi qu'avec les éléments du squelette peptidique de la protéine (groupements C=O de A100 et NH de T102 et S79 ; voir FIGURE 2.4A). Sa partie distale (la chaîne latérale), quant à elle, fait des contacts de Van der Waals avec quatre résidus hydrophobes : la leucine 77, la cystéine 78, la phénylalanine 276 et la tyrosine 18. L'isoleucine est alors située dans une cavité du lobe I qui la rend peu accessible au solvant, malgré la conformation ouverte de la protéine (Sack et al., 1989). Les interactions entre l'isoleucine et le lobe II sont de nature plus polaire. En effet, l'isoleucine établit, par le biais de son fragment glycine, une interaction ionique avec le glutamate 226, ainsi qu'une liaison hydrogène avec la tyrosine 202 et une interaction cation-π avec la tyrosine 150. Sa partie distale fait des interactions de Van der Waals avec les tyrosines 150 et 202, la glycine 227 ainsi que la chaîne latérale du glutamate 226. L'isoleucine fait donc plus d'interactions avec le lobe I qu'avec le lobe II. Ceci, ajouté au fait que l'isoleucine se fixe initialement au lobe I, indique clairement une prédominance du lobe I dans la fixation du ligand à LIVBP. Cette prédominance a été confirmée par des études de dynamique moléculaire qui montrent que, lors de l'ouverture du domaine LIVBP, les liaisons de l'isoleucine avec le lobe II sont rompues alors que celles avec le lobe I persistent encore (Trakhanov et al., 2005). La prédominance du lobe I dans la liaison du ligand a aussi été mise en évidence dans $mGlu_1$. En effet, le glutamate lié à la forme ouverte de $mGlu_1$ est parfaitement superposable au glutamate lié à la forme fermée et les facteurs de température des deux glutamates dans les structures cristallographiques ouverte et fermée sont quasiment identiques (Kunishima et al., 2000). Ceci suggére que le lobe I détermine entièrement le mode de liaison du glutamate, le lobe II ne faisant que stabiliser cette liaison.

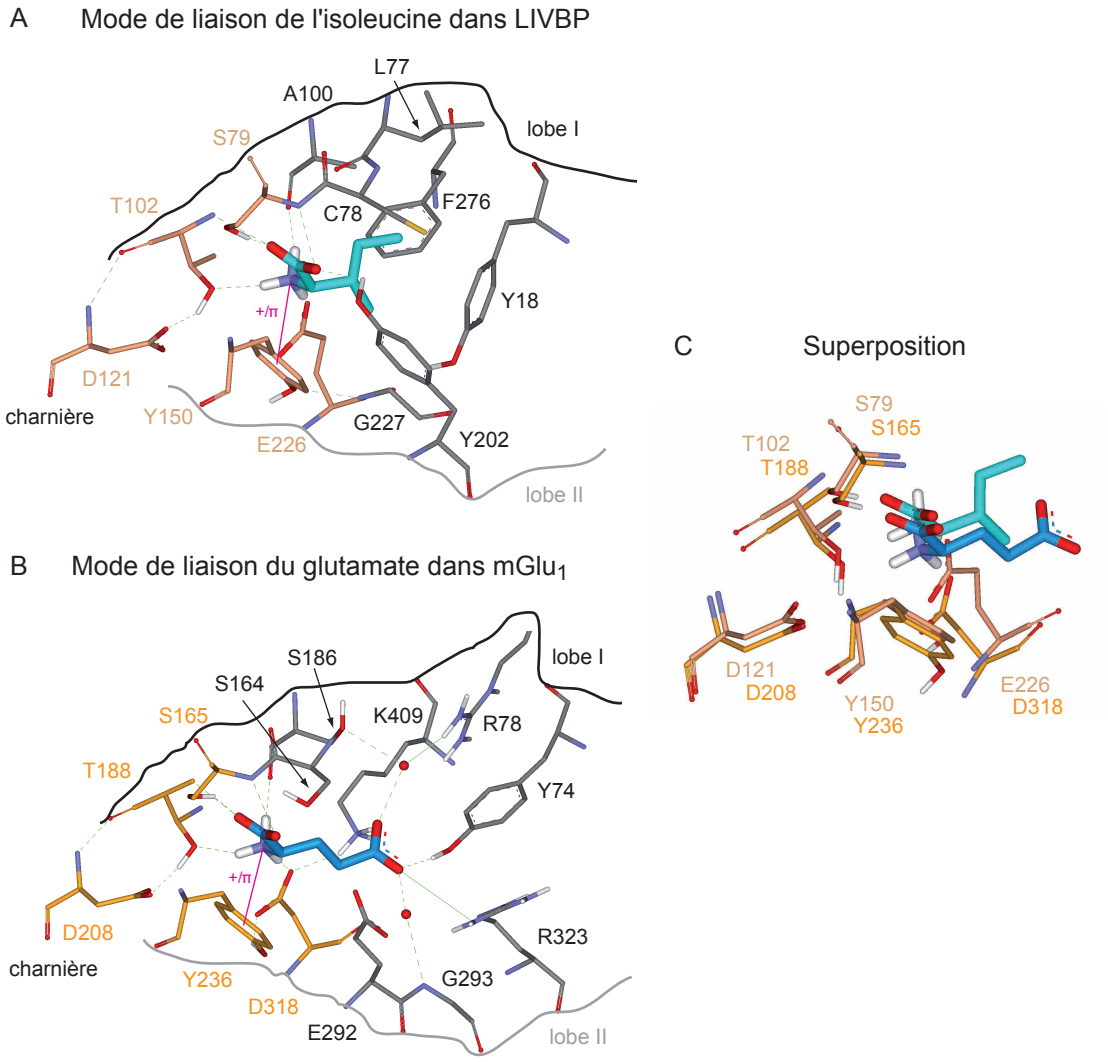


FIGURE 2.4 – Les modes de liaison des acides aminés dans les domaines de la famille LIVBP présentent des caractères communs. A, Mode de liaison de l'isoleucine dans LIVBP (pdb : 1z17). L'isoleucine et les résidus du site de liaison sont représentés sous forme de bâtonnets. Les atomes de carbone de l'isoleucine sont colorés en turquoise. Dans le site de liaison, les atomes de carbone des résidus interagissant avec la partie α-amino acide sont colorés en saumon. Les atomes de carbone des autres résidus sont colorés en gris. Les autres atomes sont représentés selon les codes couleurs conventionnels (voir Annexe). Seuls les hydrogènes liés aux fonctions hydroxyle et ammonium quaternaire sont représentés. Les liaisons hydrogène sont représentées par des traits verts pointillés ou pleins. L'interaction cation-π entre Y150 et le groupement ammonium de l'isoleucine est représentée par un trait rose. B, Mode de liaison du glutamate dans $mGlu_1$ (pdb :1ewk). La repésentation des différents atomes est la même qu'en (A), à l'exception des atomes de carbone du glutamate qui sont en bleu clair et des atomes de carbones des résidus contactant la partie α-amino acide qui sont en orange. C, Superposition des sites de liaison de l'isoleucine et du glutamate. On remarque que les résidus contactant la partie α-amino acide des ligands sont superposés.

La prédominance du lobe I dans le mécanisme de fixation des ligands semble être un mécanisme commun aux protéines de la famille LIVBP. Outre ce mode de liaison, certaines protéines de la famille LIVBP présentent aussi des similarités au niveau des résidus-mêmes interagissant avec les ligands. Un exemple frappant concerne les protéines liant les acides aminés.

Caractères communs de liaison des acides aminés parmi les protéines de la famille LIVBP

L'étude des modes de liaison du glutamate dans $mGlu_1$ et de l'isoleucine dans LIVBP révèle de fortes similitudes quant aux résidus liant le frament glycine des acides aminés (Figure 2.4A et B). En effet, trois résidus interagissant avec le fragment glycine de l'isoleucine ou du glutamate sont strictement identiques dans $mGlu_1$ et LIVBP (S79, T102 et Y150 pour LIVBP ; S165, T188 et Y236 pour mGluR1). De plus, LIVBP et $mGlu_1$ partagent aussi en commun un aspartate, D121 pour LIVBP ou D208 pour $mGlu_1$, trop éloigné pour interagir avec l'acide aminé mais positionnant la thréonine 102 ou 188. Enfin, le groupement ammonium quaternaire fait une liaison ionique avec un cinquième résidu, qui est un glutamate dans LIVBP (E226) et un aspartate dans $mGlu_1$ (D318). De façon intéressante, si l'on superpose les deux protéines $mGlu_1$ et LIVBP, on remarque que les cinq résidus impliqués dans la liaison de la partie glycine sont quasiment parfaitement superposés, ainsi que les parties glycines de LIVBP et $mGlu_1$ (Figure 2.4C). En outre, ces résidus sont strictement conservés parmi les protéines de la famille LIVBP liant les acides aminés (voir alignement en annexe et l'alignement décrit dans Acher and Bertrand 2005). Ainsi, il est fascinant de noter que des protéines partageant une si faible identité de séquence (13% d'identité) partagent une si forte similarité de structure au niveau de leur site de liaison. A partir de ce motif commun partagé par toutes les protéines de la famille LIVBP liant les acides aminés, Acher and Bertrand (2005) en ont déduit une signature permettant de trouver, dans une base de données de séquences protéiques, des protéines

de la famille LIVBP pouvant lier les acides aminés. La signature est décrite ci-dessous :

$$[S] - x(22) - [TS] - x(13,14) - [R] - x(4) - [D] - x(2) - [Q] - x(24,25) - [Y] - [GA] - x(74,84) - [ED]$$

Entre crochets sont représentés les résidus impliqués dans la signature. Par exemple, [TS] indique qu'une protéine contenant la signature peut contenir une thréonine ou une sérine à cette position. $x()$ représente le nombre de résidus séparant chaque déterminant de la signature.

Cette signature comprend les cinq résidus impliqués dans la liaison du fragment glycine ([S], [TS], [D], [Y] et [ED]), ainsi que trois résidus, [R], [Q] et [GA] qui n'interagissent pas directement avec les acides aminés, mais qui sont conservés parmi les protéines de la famille LIVBP connues pour lier les acides aminés. Cette étude a permis de trouver un récepteur de plante appartenant à la famille des iGluRs, dont le domaine N-terminal, en plus du domaine de liaison des agonistes, était susceptible de lier des acides aminés (Acher and Bertrand, 2005).

La partie distale de la poche de liaison liant la chaîne latérale des acides aminés est, quant-à elle, plus variable entre les différentes protéines. C'est, à vrai dire, cette partie qui détermine la sélectivité de la protéine pour leurs amino-acides. Ainsi, on remarque que la poche de liaison entourant la chaîne latérale de l'isoleucine dans LIVBP est de nature hydrophobe. En effet, les résidus interagissant avec la chaîne carbonée de l'isoleucine sont deux tyrosines (Y18 et Y202), une phénylalanine (F276) et une leucine (L77 ; Figure 2.4A). Au contraire, les résidus situés dans la poche de liaison du glutamate, dans $mGlu_1$, sont de nature beaucoup plus polaire et établissent des liaisons ioniques (K409, R323, E292) et des liaisons hydrogène (Y74, S186 et R78) avec le groupement carboxylate distal du glutamate (Figure 2.4B). On remarque que K409 est conservée dans tous les mGluRs (voir alignement en annexe), et que cette lysine correspond à la phenylalanine 276 chez LIVBP. La nature du résidu à cette position semble donc déterminer en partie la

nature de l'acide aminé lié. En effet, le récepteur odorant de poisson OR 5.24 est un RCPG contenant un domaine de la famille LIVBP liant les acides aminés avec une préférence pour les acides aminés basiques comme l'arginine. Il possède, en position équivalente à K409 de $mGlu_1$, une méthinonine (M389) qui contacte la chaîne carbonée de l'arginine. De façon intéressante, la mutation en lysine de cette méthionine 389 rend les récepteurs OR 5.24 sélectifs pour le glutamate, ce qui confirme l'importance de cette position dans le contrôle de la sélectivité pour le type d'acide aminé (Luu et al., 2004). Il est aussi intéressant de noter que deux tyrosines conservées entre LIVBP et $mGlu_1$, Y18 dans LIVBP et Y74 dans $mGlu_1$, interagissent toutes deux avec le ligand mais de façons différentes : dans LIVBP, Y18 fait des contacts de Van der Waals, par le biais de son groupement aromatique, avec la chaîne carbonée de l'isoleucine, alors que, dans $mGlu_1$, elle fait une liaison hydrogène avec le groupement carboxylate du glutamate, par le biais de sa fonction hydroxyle. C'est grâce aux différences des sites de liaison au niveau de la partie distale du glutamate que des antagonistes des différents sous-types de mGluRs ont pu être conçus. Ainsi, le L-AP4 est un agoniste sélectif des mGluRs du groupe III ($mGlu_4$, $mGlu_6$, $mGlu_7$ et $mGlu_8$) car sa chaîne latérale qui contient un groupement phosphonate très acide est très bien stabilisée par la poche de liaison distale des mGluRs du groupe III, qui contient beaucoup de résidus basiques (lysines et arginines ; Bertrand et al., 2002)

2.2 Assemblage et mécanismes d'activation des récepteurs comportant des domaines de type LIVBP

2.2.1 Les domaines de type LIVBP s'assemblent en dimères

Certains domaines de la famille LIVBP s'assemblent en dimères (voir FIGURE 2.2). C'est le cas des récepteurs de la famille 3 des RCPG (Pin et al., 2003), des récepteurs au peptide natriurétique (He et al., 2001), des récepteurs de la famille VKR ("venus-kinase receptors" ; Ahier et al., 2009) et des récepteurs ionotropiques du glutamate (Kumar et al.,

2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). En fait, il semble que tous les récepteurs membranaires comportant des domaines de type LIVBP s'associent en dimères au niveau de ces domaines. Ces récepteurs sont impliqués dans des phénomènes de signalisation cellulaire. Au sein d'un dimère, les changements conformationnels (ouverture et fermeture du domaine LIVBP) induits par la fixation des ligands sont facilement traduits en modifications de la distance et/ou de l'orientation entre les domaines transmembranaires (voir plus bas), ce qui permet la transmission de l'information vers le milieu intracellulaire. Ainsi, la formation d'un dimère de domaines LIVBP couplés à des segments transmembranaires semble être module structural conservé permettant le transfert d'un signal entre le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire.

Les domaines de la famille LIVBP peuvent former soit des homodimères (mGluRs par exemple), soit des hétérodimères (récepteurs $GABA_B$, iGluRs). Ces récepteurs s'assemblent selon un mécanisme commun, impliquant majoritairement des interactions de type hydrophobe entre les hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$ du lobe I (voir FIGURE 2.6). Sur $mGlu_1$, on peut effectivement observer, à l'emplacement des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$, un îlot apolaire qui constitue le coeur de l'interface de dimérisation (voir FIGURE 2.5B). On remarque de plus que chez les mGluRs, la zone de dimérisation est fortement conservée, contrairement aux zones de la protéine en contact avec le solvant (voir FIGURE 2.5A). Ceci est en accord avec un mécanisme de dimérisation conservé au sein de la famille des mGluRs. On peut observer la même conservation de l'interface de dimérisation au lobe 1 chez les autres domaines LIVBP s'associant en dimères (par exemple, chez les récepteurs $GABA_B$ (Rondard et al., 2008) ou chez la famille VKR (Ahier et al., 2009)).

L'obtention de structures cristallographiques de dimères de domaines LIVBP a été une grande avancée dans la compréhension des mécanismes d'activation des récepteurs comportant un domaine LIVBP. Nous allons détailler deux exemples, celui de $mGlu_1$ et du récepteur au peptide natriurétique NPR-C, qui illustrent deux mécanismes différents d'activation des récepteurs comportant un domaine LIVBP.

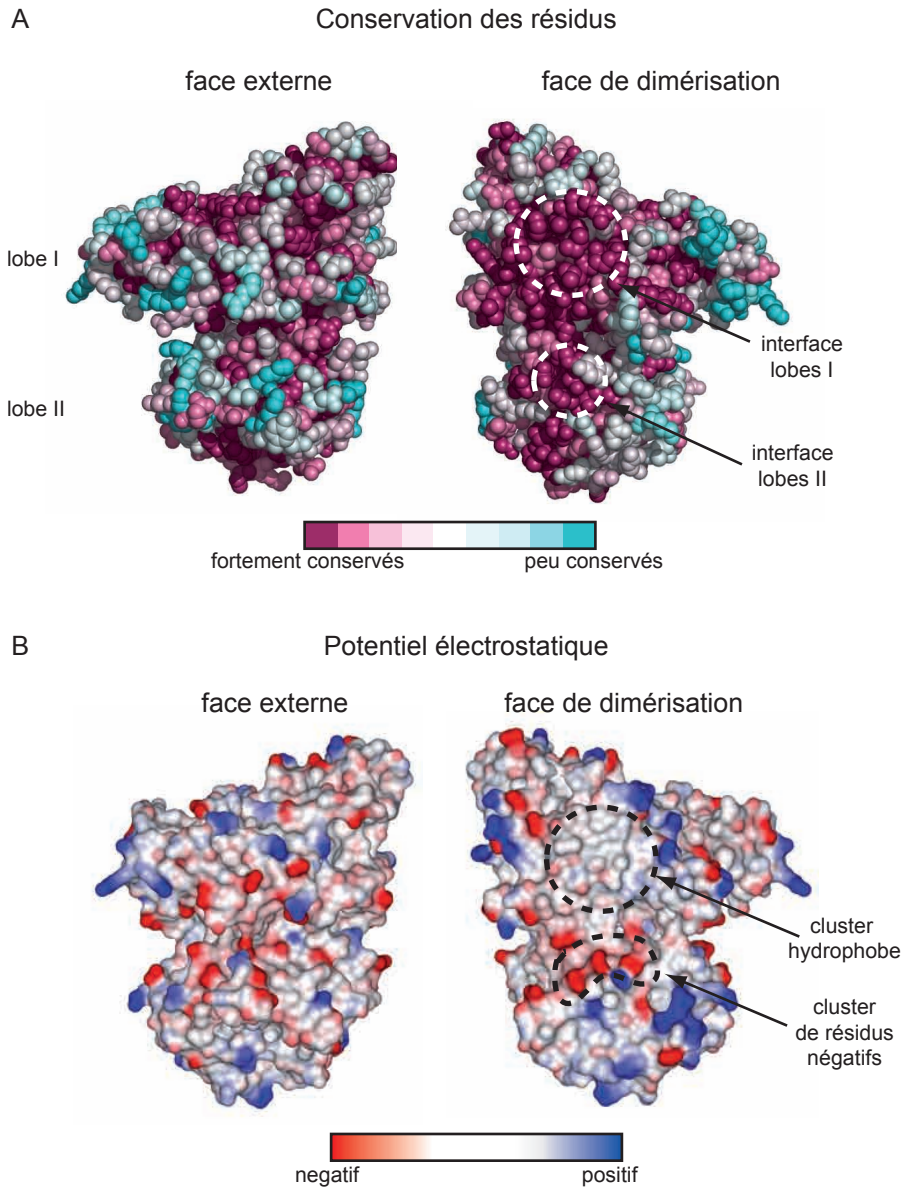


FIGURE 2.5 – A, Conservation des résidus à la surface des domaines LIVBP des mGluRs réprésentée sur la structure cristallographique de $mGlu_1$ (pdb 1EWK : A). Les scores de conservation ont été obtenus grâce au server Consurf (Consurf.tau.ac.il ; Glaser et al., 2003), à partir d'un alignement multiple incluant les séquences de $mGlu_{1-8}$ de différentes espèces (souris, rat, humain, lapin et singe ; 29 séquences). On remarque que le degré de conservation est bien plus important sur la face de dimérisation que sur la face externe. B, Surface de potentiel électrostatique du domaine LIVBP de $mGlu_1$. On note, sur la face de dimérisation, une région fortement apolaire correspondant à la zone fortement conservée mise en évidence en A.

2.2.2 Bases moléculaires de l'activation des mGluRs

Les structures cristallographiques obtenues à partir du domaine LIVBP de $mGlu_1$ ont révélé, comme discuté précédemment (voir Section 2.1.1 et FIGURE 2.3B), que chaque domaine oscille entre un état fermé et un état ouvert, la fixation du glutamate stabilisant l'état fermé. Cependant, elles ont aussi mis en évidence l'existence de deux orientations différentes des domaines LIVBP de $mGlu_1$ dans le dimère (Kunishima et al., 2000), le passage d'une orientation à l'autre se faisant par rotation autour d'un axe perpendiculaire à l'interface de dimérisation du lobe I. La première orientation, dans laquelle les lobes II des domaines LIVBP sont éloignés l'un de l'autre, a été observée lorsque les deux domaines sont en conformation ouverte, en absence d'agoniste (FIGURE 2.6) ou en présence d'un antagoniste de $mGlu_1$, la (S)-(α)-methyl-4-carboxyphenyl-glycine (S-MCPG) (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002). Cet état a donc été appelé "R" (pour "resting"), car il correspond le plus certainement à l'état inactif du récepteur. Dans la deuxième orientation, les deux lobes II sont proches l'un de l'autre et forment une deuxième interface de dimérisation. C'est ce type d'orientation qui a été mise en évidence lorsque le glutamate est lié aux domaines LIVBP de $mGlu_1$. Elle est donc susceptible de représenter l'état actif du récepteur, d'où son appellation de conformation "A" (FIGURE 2.6). L'orientation "A" a été mise en évidence, en présence de glutamate, lorsqu'un seul des domaines est fermé (conformation "fermé-ouvert/A" ; Kunishima et al., 2000) ou lorsque les deux domaines sont fermés (conformation "fermé-fermé/A"), cette dernière conformation existant en présence d'ions gadolinium (Tsuchiya et al., 2002). Le gadolinium semble nécessaire pour stabiliser la conformation "fermé-fermé/A" car une conformation "fermé-fermé/R" a été mise en évidence, pour $mGlu_3$, en l'absence de ce cation (Muto et al., 2007). Il est aussi intéressant de noter que l'on a pu aussi observer une orientation de type "A" en l'absence de ligand, ce qui laisse à penser que les dimères de domaines LIVBP de $mGlu_1$ peuvent osciller spontanément entre les conformations "ouvert-ouvert/R" et "fermé-ouvert/A", le glutamate déplaçant l'équilibre vers la conformation "fermé-ouvert/A".

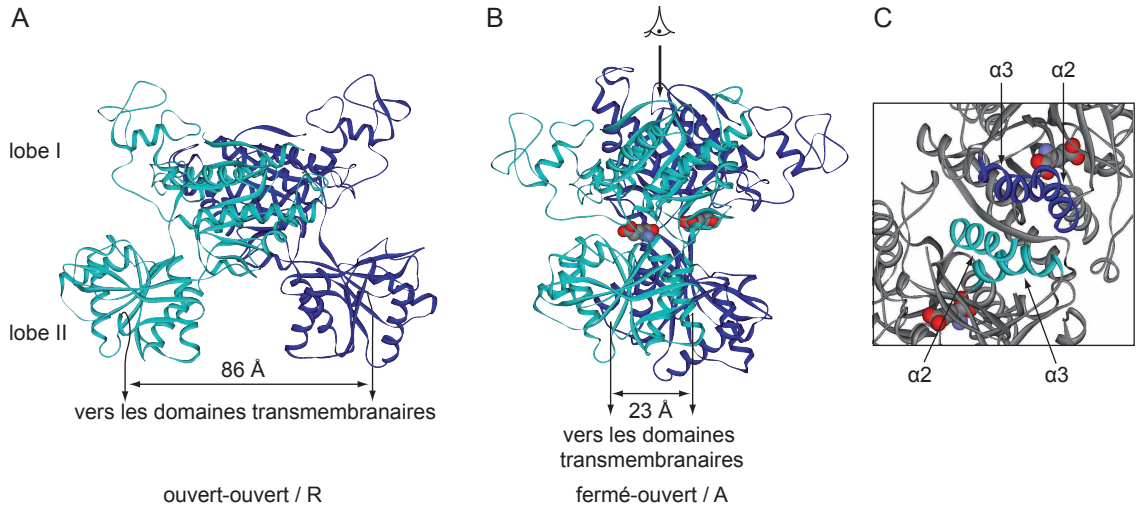


FIGURE 2.6 – Les domaines LIVBP de $mGlu_1$ adoptent différentes conformations au sein d'un dimère. A, Dimère de conformation "ouvert-ouvert/R" (pdb : 1ewt), en l'absence de glutamate. Dans cet état, les extrémités C-terminales des deux domaines sont écartées de 86 Å. Dimère de conformation "fermé-ouvert/A", en présence de glutamate (pdb : 1ewk). Dans cette conformation, les extrémités C-terminales sont beaucoup plus rapprochées, avec un écartement de 23 Å. C, gros plan sur l'interface de dimérisation au niveau des lobes I, vue depuis le dessus du dimère "fermé-ouvert/A" (vue indiquée par l'oeil en B.). Les helices $\alpha 2$ et $\alpha 3$, constituant le coeur de l'interface de dimérisation, sont colorées en bleu clair et bleu foncé.

Ainsi, les données cristallographiques nous indiquent que lorsque les deux domaines sont ouverts, c'est la forme "R" qui est favorisée, alors que la fermeture d'un seul domaine suffit à favoriser la forme "A". Quel est le mécanisme expliquant la relation "fermé/A" et "ouvert/R", et pourquoi les autres conformations ("ouvert-ouvert/A" et "fermé-ouvert/R") n'ont-elles pas été mises en évidence ? L'étude des interfaces de dimérisation au niveau des lobes II, lorsque les dimères sont en conformation "A", nous donne des éléments de réponse (Tsuchiya et al., 2002; Jingami et al., 2003). La région impliquée dans l'interface de dimérisation au niveau des lobes II est riche en résidus chargés négativement(FIGURE 2.5B). Si l'on construit un modèle de conformation "ouvert-ouvert/A", on remarque que, au niveau de l'interface de dimérisation des lobes II, deux lysines (K260) se repoussent de façon stérique et électrostatique et, de part et d'autre, des glutamates et des aspartates se font face et ont donc tendance à se repousser aussi. Il est donc fort probable que cette conformation soit énergétiquement défavorisée (FIGURE 2.7C). Au contraire, la conformation "ouvert-ouvert/R", où les deux lobes II sont éloignés, est stable car elle supprime les répulsions électroniques entre les résidus du lobe II. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que la mutation en histidine de la lysine 260 ou du glutamate 238 dans $mGlu_1$ générait des récepteurs constitutivement actifs (Jensen et al., 2001). Lorsqu'un domaine se ferme sous l'action du glutamate, les deux lysines 260 ne se font plus face dans la conformation "active" du dimère. Au contraire, elles établissent des interactions ioniques avec les glutamates et les aspartates du domaine voisin, ce qui stabilise la conformation "A" (FIGURE 2.7B). Si le deuxième domaine se ferme, le centre de l'interface de dimérisation est alors composé de deux glutamates (E238) et deux aspartates (D242) qui se font face, ce qui déstabilise la forme "A". L'ajout de gadolinium permet de neutraliser les charges de ces résidus et donc de stabiliser la forme "A" (FIGURE 2.7B).

Ainsi, le passage de la forme active à la forme inactive ("resting") des mGluRs est principalement dû à la nature de l'interface de dimérisation au niveau des lobes II, qui contient des résidus chargés qui se repoussent ou s'attirent selon les conformations individuelles de

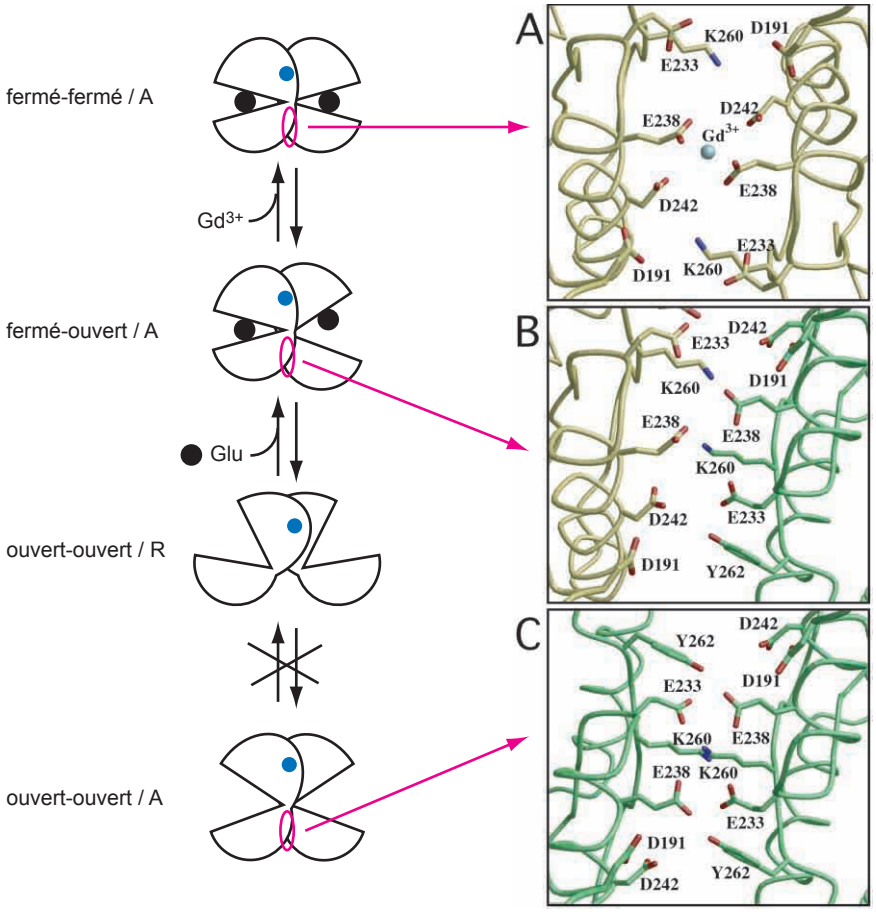


FIGURE 2.7 – Mécanismes à l'origine de l'activation des récepteurs $mGlu_1$. A gauche, différents états conformationnels des dimères de $mGlu_1$. Le rond bleu représente l'axe de rotation du dimère lors du passage de l'état "R" (repos) à l'état "A" (actif) et l'ovale rose l'interface de dimérisation au niveau des lobes II. À droite, gros plans sur les interfaces de dimèrisation au niveau des lobes II, lorsque le dimère est dans l'état actif "A". A, conformation "ferme-fermé/A" en présence de gadolinium ; B, conformation "fermé-ouvert/A" ; C, conformation putative "ouvert-ouvert/A". Les gros plans sont issus de Tsuchiya et al. (2002).

chaque domaine. Les résidus de l'interface de dimérisation au niveau des lobes II sont fortement conservés parmi les mGluRs (voir FIGURE 2.5A), en particulier E233 et E238, qui sont strictement conservés. Ceci, ajouté au fait que les domaines LIVBP de $mGlu_3$ et $mGlu_7$ adoptent des conformations similaires à ceux de $mGlu_1$ (Muto et al., 2007), nous indique que ce mécanisme d'activation est conservé parmi la famille des mGluRs. Plus généralement, ce mécanisme semble conservé parmi les récepteurs de la famille 3 des RCPG, notamment chez les récepteurs $GABA_B$ (Pin et al., 2003). Nous avons vu que la fermeture d'un seul domaine permet l'obtention de la conformation active du dimère. Sur le récepteur entier, la fermeture d'un seul domaine suffit-elle à induire un effet fonctionnel, ou est-il nécessaire d'avoir la fermeture des deux domaines LIVBP ? Les études sur les récepteurs $GABA_B$, où seule la sous-unité $GABA_{B1}$ lie le GABA, indiquent que la fermeture d'un seul domaine suffit à activer le récepteur (Kniazeff et al., 2004b). Cependant, des études sur les récepteurs $mGlu_5$ ont montré que la fermeture d'un seul domaine LIVBP n'induit qu'une activation partielle du récepteur, la fermeture des deux domaines étant nécessaire pour une activation totale (Kniazeff et al., 2004a). Ces études ont en outre montré que l'ajout de Gd^{3+} stabilise la forme "fermé-fermé/A", en accord avec les données de cristallographie. Le gadolinium et le calcium ayant des rayons ioniques similaires, il est tentant de penser que c'est le calcium qui joue le rôle du gadolinium de façon endogène (Tsuchiya et al., 2002). Cependant, s'il a été proposé que le calcium augmente les réponses des mGluRs (Saunders et al., 1998), les ions Ca^{2+} et Gd^{3+} ne semblent pas partager le même site de liaison (Kubo and Tateyama, 2005). La nature du cation endogène se fixant à l'interface de dimérisation entre les lobes II des VFDs de $mGlu_1$ est donc encore indéterminée.

2.2.3 Quand le ligand ne se fixe pas dans la crevasse interlobaire : exemple des récepteurs aux peptides natriurétiques

Les peptides natriurétiques, ANP ("atrial natriuretic peptide"), BNP ("brain natriuretic peptide") et CNP sont des hormones essentiellement cardiaques impliquées dans l'homéostasie cardiaque, l'élimination urinaire de sodium (natriurésie) et la régulation de la pression sanguine. Ces hormones agissent sur une famille de récepteurs transmembranaires couplés à une guanylyl cyclase, la famille ANPR (pour "atrial natriuretic peptide receptor"). Les membres de cette famille sont au nombre de trois (NPR-A, -B et -C). Ils s'assemblent en dimères et comportent un domaine extracellulaire appartenant à la famille LIVBP (Drewett and Garbers, 1994; Cao and Yang, 2008).

Des études cristallographiques réalisées sur le domaine extracellulaire de NPR-C en présence de CNP ont révélé que le ligand, au lieu de se lier dans la crevasse interlobaire des domaines LIVBP, se lie à l'interface de dimérisation entre les deux domaines, avec une stoechiométrie de un ligand pour deux récepteurs (He et al., 2001). L'intérieur de la crevasse contient quant à elle une chaîne de sucres issue de la glycosylation de l'asparagine 248 (Figure 2.8). CNP contacte quelques résidus situés en bas des lobes I, mais il interagit principalement avec le lobes II, entraînant le rapprochement de ces lobes II d'une distance de 20 Å par rapport à conformation non ligandée (Figure 2.8). Contrairement à mGluR1, où le rapprochement des lobes II est dû à la rotation des deux domaines au niveau de l'interface de dimérisation des lobes I, dans le cas de NPR-C, les lobes I sont parfaitement superposables dans la forme libre et la forme ligandée (Figure 2.8C ; He et al., 2001). En effet, le rapprochement des lobes II est réalisé grâce à une torsion de la charnière de chaque domaine, les lobes I restant fixes. Cette torsion entraîne, lors de la liaison du peptide, une légère ouverture de chaque domaine d'un angle de 13°. Ainsi, dans la forme non ligandée, les domaines LIVBP adoptent une conformation "fermée", alors que la liaison d'un ligand induit une conformation "ouverte" des domaines (Figure 2.8C ; He et al., 2001). Le mécanisme d'activation de NPR-C est donc original sur deux points par

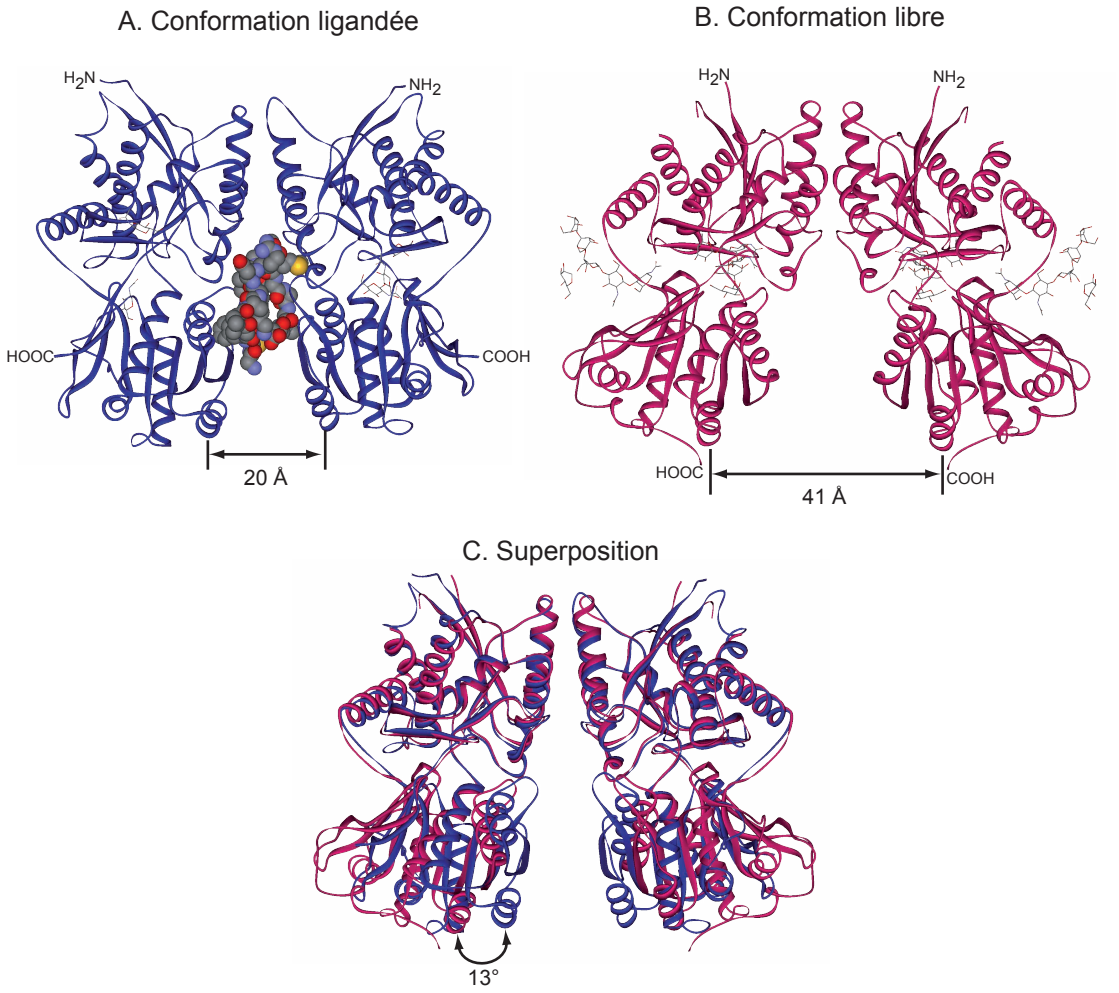


FIGURE 2.8 – Structures de la partie extracellulaire de NPR-C en présence (A, pdb : 1jdn) ou en l'absence (B, pdb : 1jdp) du peptide natriurétique CNP. Les protéines sont représentées sous forme de ruban. CNP est représenté sous forme CPK, et les sucres sous forme de bâtonnets. Les atomes sont colorés selon les codes couleurs conventionnels (voir Annexe). C, Superposition des conformation ligandée et libre. On remarque que les lobes I sont parfaitement superposés. Adapté de He et al. (2001).

rapport aux mécanismes généraux d'activation des protéines de la famille LIVBP :

- Le ligand ne se fixe pas dans l'espace interlobaire des domaines extracellulaires,
- Le ligand stabilise une conformation ouverte des domaines LIVBP. En ce sens, son mécanisme d'action est le contraire de celui du glutamate dans $mGlu_1$, car, dans $mGlu_1$ le rapprochement des lobes II est associé à une fermeture des domaines LIVBP.

Le mécanisme d'activation de NPR-C ne semble pas conservé au sein de la famille ANPR. En effet, des structures cristallographiques obtenues à partir de NPR-A en présence d'ANP ont montré que le ligand, bien que se liant aussi à l'interface de dimérisation de deux domaines LIVBP, induisait un changement conformationnel différent au sein du dimère de domaines extracellulaires (Ogawa et al., 2004). Dans le cas de NPR-A, l'ANP induit une rotation rigide des domaines LIVBP l'un par rapport à l'autre (les lobes I et II bougent tous les deux) qui ne modifie pas la distance entre les lobes II. Cette différence de mécanisme d'activation entre NPR-C et NPR-A reflète probablement la différence de fonction biologique entre NPR-C, d'un côté, et NPR-A et NPR-B, de l'autre côté (Ogawa et al., 2004). En effet, contrairement à NPR-A et NPR-B, NPR-C n'est pas couplé à la guanylyl cyclase et n'induit donc pas les fonctions hormonales classiques des peptides natriurétiques. Il lie indifféremment ANP, BNP, CNP, ainsi que leurs produits de dégradation, afin d'éliminer l'excès de peptides dans la circulation (Ogawa et al., 2004).

2.3 Structure et assemblage des domaines N-terminaux des récepteurs ionotropiques du glutamate

Contrairement aux protéines périplasmiques et aux domaines extracellulaires des RCPG de classe 3 pour lesquelles de nombreuses structures cristallographiques existent, la structure des domaines N-terminaux des iGluRs est longtemps restée inconnue. Les seules indications sur la structure de ces domaines étaient des modèles par homologie, à partir

des structures de la LIVBP (Paoletti et al., 2000) ou de mGluR1 (Ayalon et al., 2005; Malherbe et al., 2003; Mony et al., 2009b). Cependant, à cause de la faible identité de séquence entre les NTDs des iGluRs et LIVBP ou $mGlu_1$ (10 à 13%), les modèles par homologie ne donnaient qu'une image imprécise de ces domaines. Ce n'est que très récemment que des structures de NTD de iGluRs ont été résolues. On dispose désormais d'une structure cristallographique par sous-type d'iGluRs : celle de GluA2 pour les récepteurs AMPA (Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009), celle de GluK2 pour les récepteurs kainate (Kumar et al., 2009) et celle de GluN2B pour les récepteurs NMDA (Karakas et al., 2009). On dispose également d'une structure de récepteurs complet AMPA comprenant quatre sous-unités GluA2 qui nous donne des informations sur l'arrangement tétramérique des différentes sous-unités (Sobolevsky et al., 2009 et voir Section 1.2.2).

2.3.1 Les domaines N-terminaux des récepteurs AMPA et kainate

D'après les structures cristallographiques obtenues, les NTD des sous-unités GluA2 et GluK2 ont une forme bilobaire, chaque lobe étant composé d'un feuillet β central flanqué d'hélices α. Les deux lobes sont reliés entre eux par trois boucles formant une charnière. Les structures cristallographiques et les expériences d'ultra-sédimentation ont de plus montré que les NTDs de ces sous-unités s'assemblaient en dimères par le biais des hélices $\alpha 2$ et $\alpha 3$, comme cela avait été montré pour les mGluRs et les ANPRs (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). La structure globale et le mode de dimérisation des NTDs des récepteurs AMPA et kainate sont donc, comme cela avait été prédit, similaires à ceux des protéines de la famille LIVBP. Cependant les NTDs des récepteurs AMPA et kainate présentent certaines particularités par rapport aux autres protéines de la famille LIVBP qui font que les modèles par homologie des NTDs qui avaient été construits à partir de LIVBP ou de $mGlu_1$ ne sont pas exacts :

1. Il existe trois boucles, une sur le sommet du lobe I, une sur la face de dimérisation et sur sur la face externe des domaines qui, bien que situées au même endroit dans

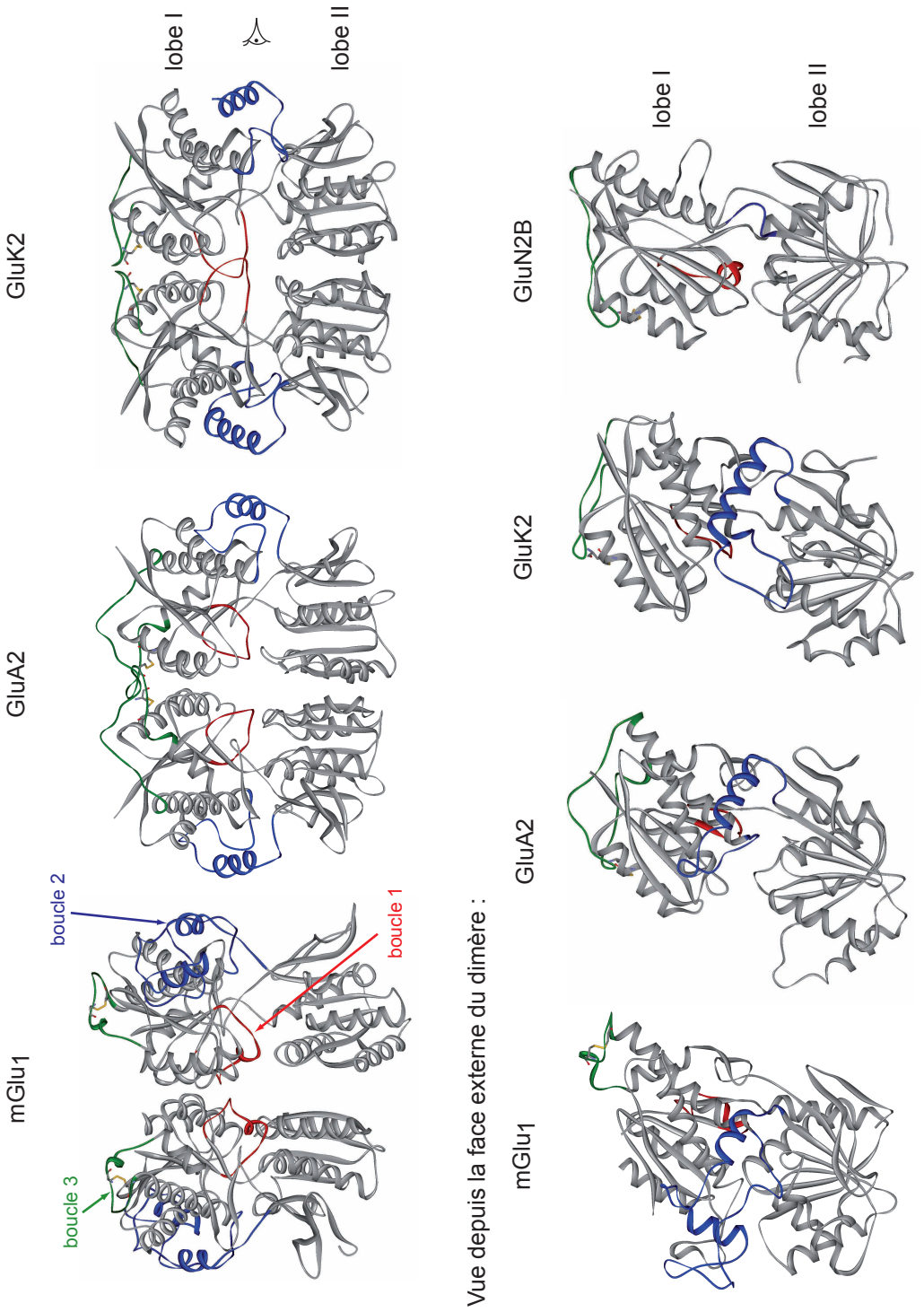
la séquence, adoptent des structures complètement différentes entre les différentes familles de récepteurs : mGluRs, récepteurs AMPA et récepteurs kainate (FIGURE 2.9 et alignement en annexe).

2. Contrairement à $mGlu_1$ pour lequel la dimérisation entre domaines LIVBP se fait quasiment exclusivement par le biais du lobe I, dans les NTDs des récepteurs AMPA et kainate, il existe une importante interface de dimérisation au niveau des lobes II.
3. Le degré de fermeture des NTDs diffère de ceux de LIVBP ou $mGlu_1$ (FIGURE 2.13).

Nous allons détailler ces trois points.

Sur les NTDs des sous-unités GluA2 et GluK2, on trouve trois boucles dont la structure diffère entre sous-unités. La première boucle (en rouge sur la FIGURE 2.9) est située au niveau de la face de dimérisation, entre les feuillets $\beta 4$ et $\beta 5$. Alors que la boucle 1, dans $mGlu_1$, établit des contacts exclusivement avec le lobe I du domaine adjacent, cette boucle, dans GluK2 se projette dans l'espace interlobaire du domaine voisin et s'interpose entre les lobes I et II. Par contre, la boucle correspondante de GluA2, étant plus petite que celle de GluK2 (voir alignement en annexe), n'établit aucun contact avec le domaine adjacent. La deuxième boucle (en bleu sur la FIGURE 2.9) est en réalité la combinaison d'une boucle et de l'hélice $\alpha 9$, qui n'est pas présente dans toutes les protéines de la famille LIVBP. Elle n'est notamment pas présente chez les récepteurs NMDA (voir plus bas). Elle est située sur la face externe du dimère, au niveau de la charnière, entre le brin $\beta 10$ et l'hélice $\alpha 10$. Sur $mGlu_1$, cette boucle est complètement localisée au niveau du lobe I, formant la "décoration" spécifique aux mGluRs. Sur GluA2, la boucle 2 interagit aussi

FIGURE 2.9 – Trois boucles ont des structures différentes sur les NTDs des iGluRs par rapport au domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$. Panneau du haut : représentations sous forme de ruban des dimères de NTDs des sous-unités $mGlu_1$ (pdb : 1ewk), GluA2 (pdb : 3h5v) et GluK2 (pdb : 3h6g). Les boucles 1, 2 et 3 sont représentées en rouge, bleu et vert, respectivement. Les cystéines impliquées dans le pont disulfure maintenant la structure de la boucle 3 sont représentées sous forme de bâtonnets avec les codes couleurs conventionnels (voir Annexe). Panneau du bas : structures des NTDs de $mGlu_1$, GluA2, GluK2 et GluN2B vues depuis la face externe du dimère, symbolisée par l'oeil sur le panneau du haut. On remarque que la boucle 2 a des structures et des positions différentes entre les différentes sous-unités.


lobe I
lobe II
GluK2
GluA2
mGlu1
boucle 2
boucle 1
boucle 3
Vue depuis la face externe du dimère :
lobe I
lobe II
GluN2B
GluK2
GluA2
mGlu1

essentiellement avec le lobe I, mais elle établit aussi quelques contacts avec le lobe II, par le biais de la boucle située entre les brins β9 et β10. Par contre, sur GluK2, cette boucle, plus longue que sur GluA2, se projette du lobe I vers le lobe II pour établir des contacts avec les deux lobes. La boucle 2, sur GluK2, semble donc fortement contraindre la conformation des domaines au sein du dimère (voir plus bas). Enfin, la boucle 3 coiffe le sommet du lobe I. Sur $mGlu_1$, cette boucle est rejetée à l'extérieur du dimère. Au contraire, sur GluA2 et GluK2, cette boucle, grâce à un pont disulfure avec l'hélice α2 du même domaine, se projette vers l'interface de dimérisation et participe aux interactions inter-dimères au niveau du lobe I. Les cystéines impliquées dans le pont disulfure sont strictement conservées chez tous les iGluRs, suggérant que la boucle 3 adopte la même conformation au sein des iGluRs. On remarque de plus que cette boucle est conservée au sein d'un même sous-type (surtout au sein des récepteurs AMPA et, dans une moindre mesure, au sein des récepteurs kainate), alors qu'elle ne l'est plus du tout lorsqu'on prend en compte l'ensemble des récepteurs AMPA et kainate (FIGURE 2.10). Il est donc tentant de suggérer que la boucle 3 soit un élément crucial dans le contrôle de l'hétérodimérisation entre les différents sous-types d'iGluRs (AMPA et kainate), comme cela avait déjà été observé Ayalon and Stern-Bach (2001).

Nous avons vu dans la Section 2.2 que les domaines extracellulaires de $mGlu_1$ ou de NPR-C formaient, en l'absence de ligand, des dimères en interagissant essentiellement par le biais de leurs lobes I. Lorsque les domaines LIVBP de $mGlu_1$ adoptent une conformation"A", il existe aussi une interface de dimérisation au niveau des lobes II, mais celle-ci est relativement restreinte (FIGURE 2.11). Au contraire, les domaines N-terminaux de GluA2 et GluK2 présentent, en plus de l'interface de dimérisation au niveau des lobes I, une importante surface de dimérisation au niveau des lobes II (FIGURE 2.11). Ainsi, alors que le dimère de $mGlu_1$ présente une surface enfouie de $880 Å^2$ dans la conformation "R", les dimères de GluA2 et GluK2 présentent des surfaces enfouies de $1408\,Å^2$ et $1536\,Å^2$, respectivement (Kumar et al. (2009); Jin et al. (2009). La dimérisation au niveau des lobes II

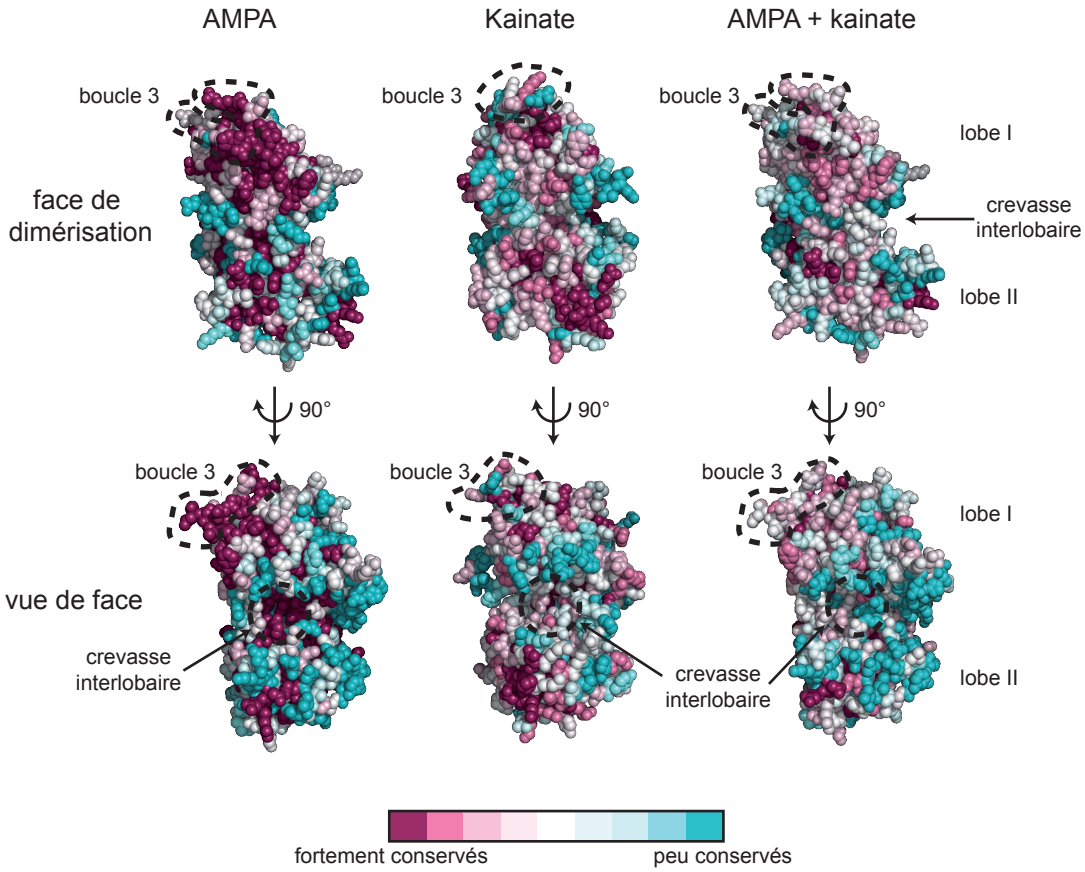


FIGURE 2.10 – Conservations des résidus à la surface des NTDs des récepteurs AMPA (gauche), kainate (milieu) et AMPA+kainate (droite) représentées sur la structure de GluA2 (conservations des NTDs récepteurs AMPA et AMPA+kainate) et celle de GluK2 (conservations des NTDs récepteurs kainate). Les scores de conservation ont été obtenus grâce au server Consurf (Consurf.tau.ac.il, Glaser et al. (2003)), à partir d'un alignement multiple incluant les séquences de différentes espèces codant pour GluA1-4 pour les récepteurs AMPA (17 séquences), GluK1-5 pour les récepteurs kainate (19 séquences) et GluA1-4 et GluK1-5 pour l'ensemble AMPA + kainate (36 séquences). Les codes couleurs sont les mêmes que ceux utilisés FIGURE 2.5.

est permise par un îlot de résidus hydrophobes chez GluA2 et GluK2 (FIGURE 2.12), qui, chez $mGlu_1$, sont remplacés par des résidus chargés négativement (voir FIGURE 2.5. Ces résidus hydrophobes sont situés sur l'hélice $\alpha 5$ et le feuillet $\beta 7$ et sont généralement conservés ou substitués de façon conservative au sein des récepteurs AMPA et kainate (voir FIGURE 2.10 et alignement iGluRs en annexe). Autour de cet îlot central de résidus hydrophobes, les interactions inter-domaines au niveau des lobes II sont renforcées par des résidus polaires formant des liaisons hydrogène.

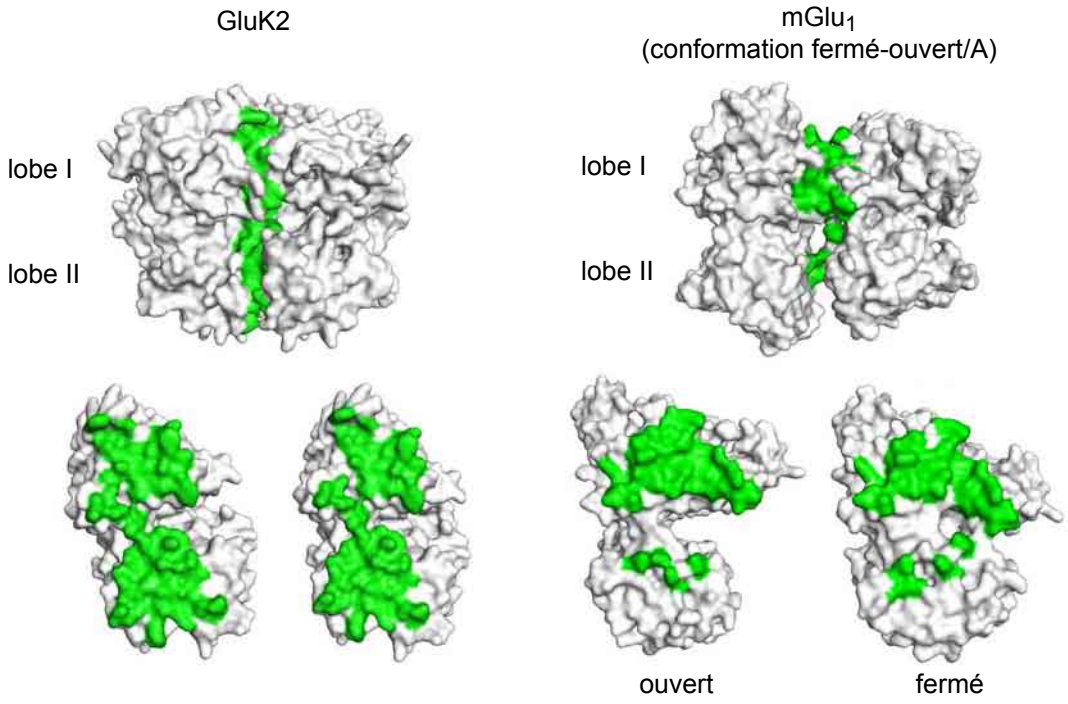


FIGURE 2.11 – Comparaison des interfaces de dimérisation entre les NTDs de GluK2 et de $mGlu_1$. Surfaces moléculaires des dimères de NTDs de GluK2 (pdb : 3h6g) et de $mGlu_1$ en conformation "fermé-ouvert/A" (pdb : 1ewk). Les résidus possédant des atomes non accessibles au solvant sont colorés en vert. D'après Kumar et al. (2009).

La conséquence de cette forte interaction entre domaines, à la fois au niveau des lobes I et II est que, contrairement aux domaines extracellulaires de $mGlu_1$ qui peuvent subir des changements conformationnels importants, les NTDs des récepteurs AMPA et kainate ont très probablement une conformation figée. En effet, l'adoption d'une conformation

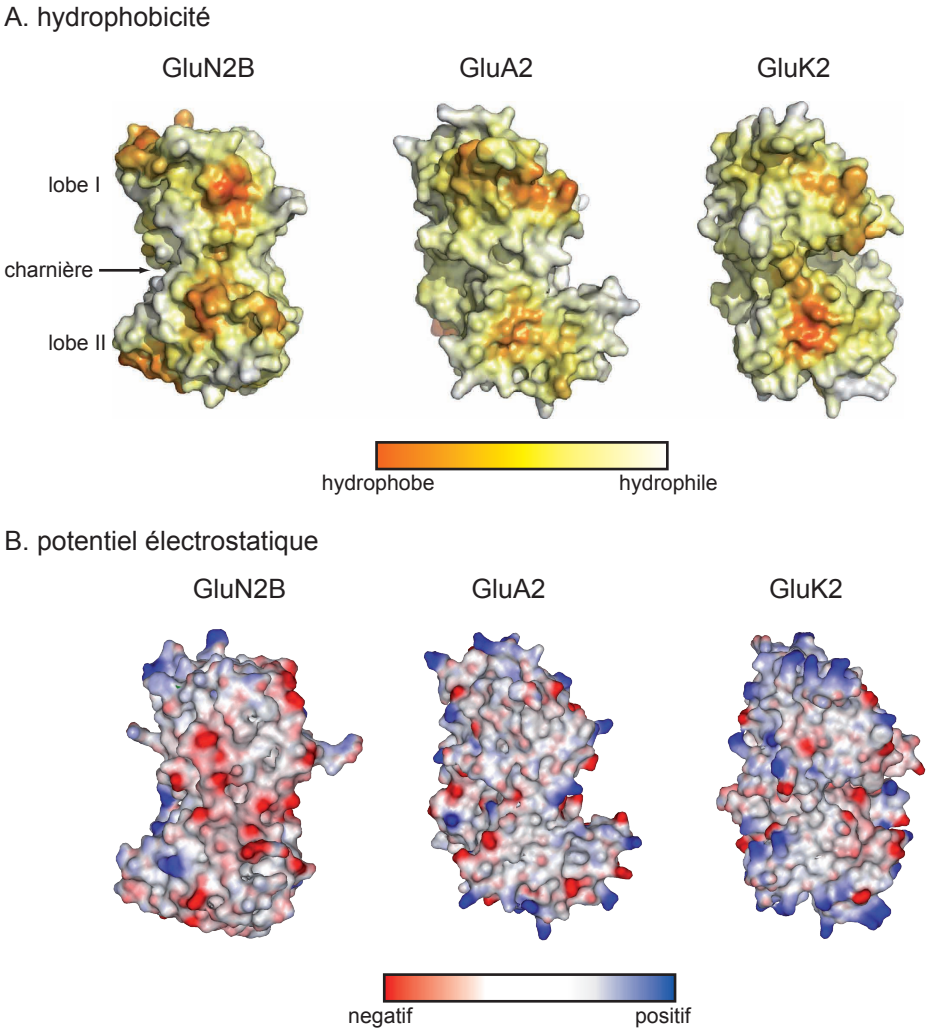


FIGURE 2.12 – A, Hydrophobicité des résidus à la surface des NTDs de GluN2B, GluA2 et GluK2. Les NTDs sont vus depuis leur face de dimérisation. On remarque un îlot de résidus hydrophobes sur les lobes II des NTDs de GluA2 et GluK2, mais pas sur celui de GluN2B. D'après Karakas et al. (2009). B, Potentiel électrostatique à la surface des NTDs de GluN2B, GluA2 et GluK2. On remarque que le centre du lobe II de GluN2B est chargé négativement, contrairement aux lobes II de GluA2 et GluK2 qui sont neutres.

"R", comme dans $mGlu_1$, entraînerait l'exposition au solvant des résidus hydrophobes du lobe II, ce qui est énergétiquement défavorable. De plus, contrairement aux autres domaines LIVBP qui peuvent osciller entre un état fermé et un état ouvert, un degré d'ouverture unique a été observé chez les NTDs de GluA2 et GluK2. Comparés à $mGlu_1$ ou LIVBP, ces domaines ne sont ni complètement ouverts, ni complètement fermés, mais adoptent un état d'ouverture intermédiaire, comme les superpositions de GluK2 et de $mGlu_1$ en conformation ouverte ou fermée l'illustrent bien (FIGURE 2.13). Dans la sous-unité GluK2, la contrainte des domaines en une conformation semi-ouverte est renforcée par les boucles 1 et 2 qui les maintiennent à une distance fixe, soit en interagissant avec les deux lobes dans le cas de la boucle 2, soit en s'interposant entre les deux lobes du domaine voisin dans le cas de la boucle 1 (FIGURE 2.9). Dans GluA2, les boucles 1 et 2 bien que plus courtes, jouent aussi un rôle de maintient de la conformation semi-ouverte Jin et al. (2009). On note cependant que le NTD de GluA2 est plus fermé que celui de GluK2, peut-être à cause des boucles 1 et 2, qui, plus courtes, permettent une fermeture plus importante des domaines.

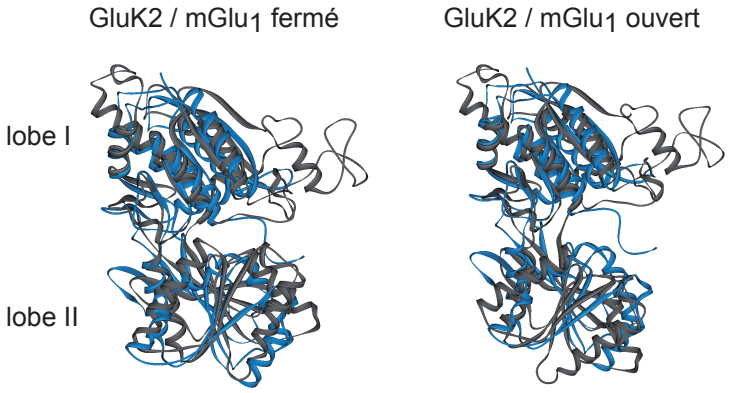


FIGURE 2.13 – Les NTDs des récepteurs AMPA et kainate adoptent un degré d'ouverture intermédiaire comparé à $mGlu_1$. À gauche, superposition au niveau des lobes I de GluK2 (en bleu) et de $mGlu_1$ en conformation fermée (en gris). À droite, superposition au niveau des lobes I de GluK2 (en bleu) et de $mGlu_1$ en conformation ouverte (en gris).

Ainsi, les domaines LIVBP des iGluRs ont évolué de façon à remplir leur fonction de contrôle de l'association entre sous-unités. Cette association est rendue possible grâce aux

multiples surfaces de contacts au sein d'un dimère (boucles 3, lobes I et II) qui rendent ces assemblages beaucoup plus stables en solution (Kd de 0.3 à 15 μM, Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009) que les domaines de liaison des agonistes (Kd de l'ordre du millimolaire ; Weston et al., 2006). La boucle 3 étant conservée au sein d'un même sous-type (AMPA ou kainate), mais pas entre sous-types, elle semble impliquée dans la sélectivité de dimérisation des sous-unités au sein d'un même sous-type. De plus, à cause de cette interaction forte au niveau des lobes II et des boucles 1 et 2, les domaines semblent figés dans une conformation semi-ouverte. Cependant, bien que la conformation du dimère de GluK2 soit certainement figée, la situation pourrait être plus nuancée pour le dimère de GluA2. En effet, dans le dimère de GluA2, les interactions stabilisant ce type de conformation sont moins fortes que dans GluK2 : l'îlot hydrophobe impliqué dans l'interface entre lobes II est moins important (FIGURE 2.12), et les boucles 1 et 2 sont plus courtes donc font moins d'interactions interlobaires. L'analyse du "B-factor" des résidus du dimère GluA2 a en outre montré que les résidus du lobe II avaient une importante flexibilité par rapport aux résidus du lobe I Clayton et al. (2009). Ces résultats semblent indiquer que, contrairement à GluK2, les NTDs de GluA2 seraient capables de subir certains changements conformationnels. Il est aussi intéressant de noter que l'interieur de la crevasse interlobaire est très bien conservé au sein des récepteurs AMPA (mais pas au sein des récepteurs kainate, voir FIGURE 2.10). On pourrait donc imaginer que les NTDs des récepteurs AMPA soient capables de lier un ligand, comme cela a été montré pour les récepteurs NMDA Clayton et al. (2009). Les NTDs des récepteurs AMPA ne possèdent pas la signature des protéines LIVBP liant les aminoacides (voir Section 2.1.2), le ligand potentiel des NTDs des récepteurs AMPA n'est donc pas un acide aminé. La crevasse interlobe étant majoritairement chargée positivement, il est tentant de supposer que ce ligand, s'il existe, sera très certainement chargé négativement.

2.3.2 Structure du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA : un domaine LIVBP "tordu"

Comme discuté dans la Section 1.3.2, les NTDs des récepteurs NMDA jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de ces récepteurs, notamment par la fixation d'ions ou de petites molécules tels que le zinc et l'ifenprodil (Mony et al., 2009a). Bien que de nombreuses expériences de mutagénèse dirigée et de modélisation moléculaire aient été réalisées, la structure de ces domaines et le mode de liaison de leurs ligands a jusqu'à présent été imprécise, à cause d'un manque de protéines de référence partageant un fort taux d'identité avec ces domaines. Même les NTDs des récepteurs AMPA et kainate ne partagent que 12 à 13 % d'identité de séquence avec les NTDs des récepteurs NMDA. Récemment, des structures cristallographiques du NTD de GluN2B ont été résolues, en présence ou en absence de zinc (Karakas et al., 2009). Ces structures révèlent que le NTD de NR2B a un repliement similaire aux protéines de la famille LIVBP, comme cela avait été prédit (O'Hara et al., 1993; Paoletti et al., 2000). Contrairement aux NTDs de GluA2 et GluK2, le domaine a été cristallisé sous forme fermée, que ce soit en présence ou en absence de zinc. La présence d'une forme fermée en présence de zinc confirme ce qui avait prédit sur le mécanisme d'action du zinc (Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005). L'existence d'une forme fermée du NTD en l'absence de ligand peut paraître étonnante. En effet, en l'absence de ligand, les protéines de la famille LIVBP ont généralement été mises en évidence sous forme ouverte. Cependant, il a été montré que les oscillations spontanées (en l'absence de ligand) du NTD de la sous-unité GluN2 entre une forme fermée et une forme ouverte étaient responsables de la probabilité d'ouverture non maximale des récepteurs NMDA, l'état fermé du NTD correspondant à l'état inactif du canal (Gielen et al., 2009 et voir Section 1.3.2). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité NR2B ayant une faible probabilité d'ouverture ($Po(max) < 0,1$; Gielen et al., 2009), il est probable que l'état fermé soit l'état le plus stable du NTD de NR2B (voir Karakas et al., 2009).

Contrairement aux autres iGluRs, aucun dimère de NTDs de GluN2B n'a été mis

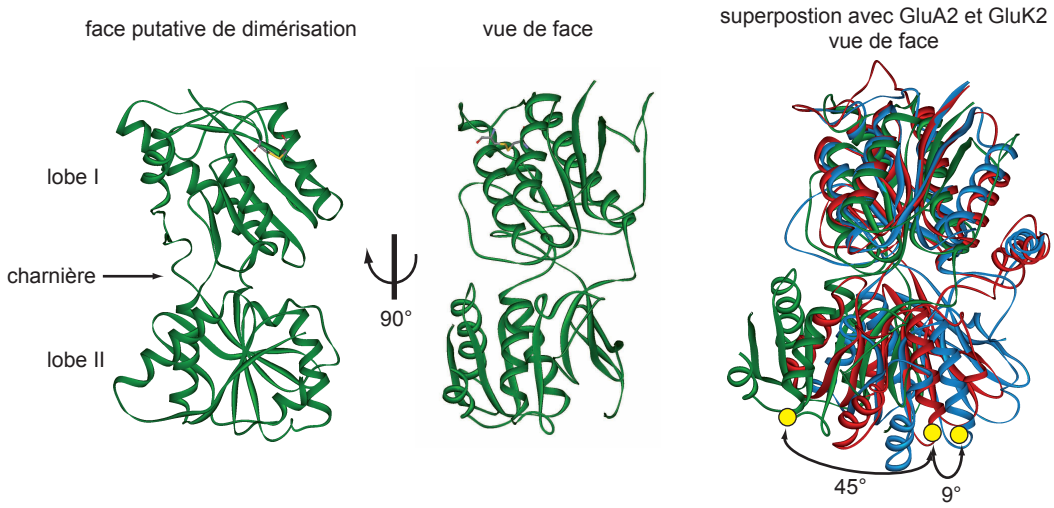


FIGURE 2.14 – Structure du NTD de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA. La protéine est réprésentée sous forme de ruban. Sur la vue de face, on remarque la torsion du domaine, les lobes I et II ne se faisant pas face. À droite, superposition du NTD de GluN2B (en vert) avec les NTDs de GluA2 (en rouge) et GluK2 (en bleu). Les ronds jaunes représentent des positions équivalentes sur les trois NTDs.

en évidence en solution (Karakas et al., 2009). Les récepteurs NMDA sont des hétérotétramères le plus souvent formés de deux sous-unités GluN1 et deux sous-unités GluN2. Il se peut que l'absence de formation en solution d'homodimères GluN2B-GluN2B reflète le fait que le NTD de GluN2B s'associe exclusivement sous forme d'hétérodimère avec la sous-unité GluN1. Sobolevsky et al. (2009) proposent en effet que les NTDs des récepteurs NMDA forment des hétérodimères GluN1-GluN2, mais cette proposition reste à confirmer (voir Section 1.2.2). Les lobes I et II du NTD de GluN2B pris individuellement sont superposables aux lobes I et II des NTDs des récepteurs AMPA et kainate (FIGURE 2.14). En particulier, la boucle 3, qui coiffe le lobe I, est aussi reliée par un pont disulfure à l'hélice $\alpha 2$ et se projette aussi vers l'interface de dimérisation putative du domaine. Contrairement aux récepteurs AMPA et kainate pour lesquels cette boucle est conservée au sein d'une même famille, la boucle 3 est très peu conservée entre les différentes sous-unités des récepteurs NMDA (d'où l'appellation de "boucle hypervariable" par Karakas et al., 2009). Comme elle est susceptible d'être impliquée dans la dimérisation des différentes sous-

unités, on peut supposer que cette boucle participe au contrôle des associations spécifiques entre sous-unités. Il existe cependant une différence majeure entre le NTD de GluN2B et les autres protéines de la famille LIVBP. Cette différence réside dans une importante torsion de la charnière du domaine, qui fait que les lobes I et II sont décalés l'un par rapport à l'autre. Si l'on superpose les NTDs de GluN2B, GluA2 et GluK2, on observe une torsion d'un angle 45° par rapport à GluA2 et d'un angle de 54° par rapport à GluK2 (FIGURE 2.14). L'existence fonctionnelle de cette torsion a été validée par le fait que la mutation en alanine de E284, résidu contactant le zinc dans la structure "tordue", mais éloigné du site putatif de liaison du zinc dans les modèles par homologie construits à partir de LIVBP ou de $mGlu_1$, diminue la sensibilité au zinc des récepteurs GluN1/GluN2B (Karakas et al., 2009). Notre équipe à aussi montré que la mutation dans GluN2A de l'aspartate D283, l'équivalent de GluN2B-E284, entraînait aussi une forte diminution de la sensibilité au zinc des récepteurs GluN1/GluN2A, suggérant que cette torsion est conservée parmis les différentes sous-unités des récepteurs NMDA (données non publiées). Des torsions entre lobes I et II avaient déjà été observées chez certaines protéines de la famille LIVBP, en particulier chez les domaines extracellulaires des récepteurs NPR-C, pour lesquels les lobes II se rapprochent afin de former le site de liaison du CNP (voir Section 2.2.3). Cependant aucune torsion de cette ampleur n'avait déjà été observée. Quelle est l'origine de cette torsion chez GluN2B, qui n'existe pas dans les NTDs de GluA2 et GluK2 ? On remarque que les NTDs de GluA2 et GluK2 ont une boucle, la boucle 2, qui établit des contacts avec les les lobes I et II des NTDs. Cette boucle est inexistante chez les récepteurs NMDA (FIGURE 2.9). De plus on remarque que GluA2, qui a une boucle 2 plus courte que GluK2, présente une légère torsion par rapport à ce dernier (FIGURE 2.14). Ainsi, l'absence de boucle 2 dans les NTDs des récepteurs NMDA serait à l'origine d'une plus grande flexibilité de la charnière, ce qui rendrait possible cette torsion. Cependant, ce n'est certainement pas le seul déterminant de la conformation "tordue" du NTD de GluN2B, car certaines PBP liant les sucres ne possèdent pas non plus de boucle 2 et pourtant aucune

torsion de ce type n'a été observée chez ces protéines (voir alignement).

L'existence de cette conformation "tordue" a pour première conséquence que les modèles par homologie construits à partir de LIVBP et $mGlu_1$ sont en partie faux, et qu'il faut repenser les conclusions émises à partir de ces modèles. Une autre conséquence de cette torsion est que, si l'on essaye de reconstruire un dimère de NTDs de sous-unités GluN2B à partir des dimères obtenus pour les NTDs des récepteurs AMPA et kainate, on observe que les lobes II se téléscopent (Karakas et al., 2009). On obtient le même résultat si l'on superpose les NTD de GluN2B avec $mGlu_1$ en conformation "A" ou avec NPR-C en conformation non ligandée, où pourtant les lobes 2 sont relativement écartés (données personnelles). De fait, les NTDs de GluN2B dans cette conformation "fermée-tordue" ne peuvent former des homodimères de conformation "A" conventionnelle. La seule conformation de dimère connue qui peut accommoder un dimère de NTDs de GluN2B est la conformation "R" qu'adoptent les domaines extracellulaires de $mGlu_1$ en l'absence de ligand. Effectivement, du fait des propriétés de l'interface de dimérisation putative du NTD de GluN2B, il est plus probable que le dimère résultant ressemble à celui de $mGlu_1$ plutôt qu'à celui des NTDs de GluA2 et de GluK2. En effet, les NTDs de GluA2 et de GluK2 comportent au sein de leurs lobes II un îlot hydrophobe qui induit une forte interaction entre les lobes II au sein du dimère et donc une conformation relativement figée de ce dimère (Figure 2.12A). Ce n'est pas le cas du NTD de GluN2B, qui, sur la face de dimérisation au niveau des lobes II, comporte des résidus chargés négativement (Figure 2.12B), comme les domaines LIVBP de $mGlu_1$. On pourrait donc imaginer qu'un dimère de NTDs de récepteurs NMDA, lorque ses domaines s'ouvrent ou se ferment, subisse des changements conformationnels qui ressemblent à ceux des domaines extracellulaires de $mGlu_1$. La "souplesse" des NTDs des récepteurs NMDA est en accord avec la fonction régulatrice de ces NTDs, qui contrôlent l'activité du canal ionique par des ouvertures et fermetures, soit spontanées, soit induites par un ligand (Gielen et al., 2008, 2009). Au contraire les NTDs des récepteurs AMPA, ayant un rôle majoritairement d'assemblage,

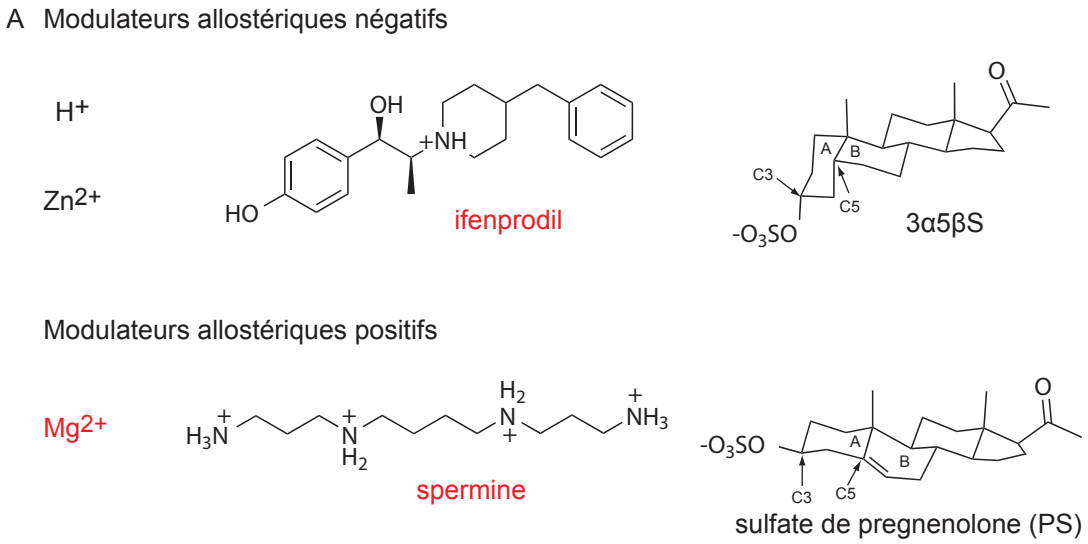
ont une conformation beaucoup plus figée.

Chapitre 3

Modulation allostérique des récepteurs NMDA

Parmi les iGluRs, les récepteurs NMDA sont ceux qui présentent le plus de sites de régulation reconnaissant des petites molécules ou des ions (Dingledine et al., 1999; Mony et al., 2009a). Outre les nombreuses molécules, agonistes et antagonistes compétitifs et bloqueurs du pore (Mg^{2+} et MK801, par exemple), qui se lient directement au coeur fonctionnel des récepteurs NMDA, les domaines de liaison des agonistes et le canal ionique (voir Section 1.3), il existe un grand nombre de molécules se liant dans des regions des récepteurs NMDA distantes de ces modules principaux d'activation (Figure 3.1). Ce sont ces molécules, appelées modulateurs allostériques, que nous allons étudier.

Les modulateurs allostériques présentent plusieurs avantages par rapport aux ligands compétitifs. Tout d'abord, parce qu'ils perturbent peu la liaison des agonistes naturels, ils respectent mieux la fonction du récepteur : ils modulent l'activité du récepteur au lieu de le rendre en permanence actif ou inactif, comme cela peut avoir lieu avec des agonistes ou des antgonistes compétitifs. De plus, comme leur fixation ne nécessite pas le déplacement des agonistes naturels, ils peuvent être utilisés à des concentrations plus faibles que les ligands compétitifs. Enfin, les poches de liaison des agonistes sont généralement fortement conservées, ce qui implique qu'il est difficile de concevoir des agonistes et antagonistes sélectifs d'un sous-type de récepteur (même si cela est tout de même possible pour cer-



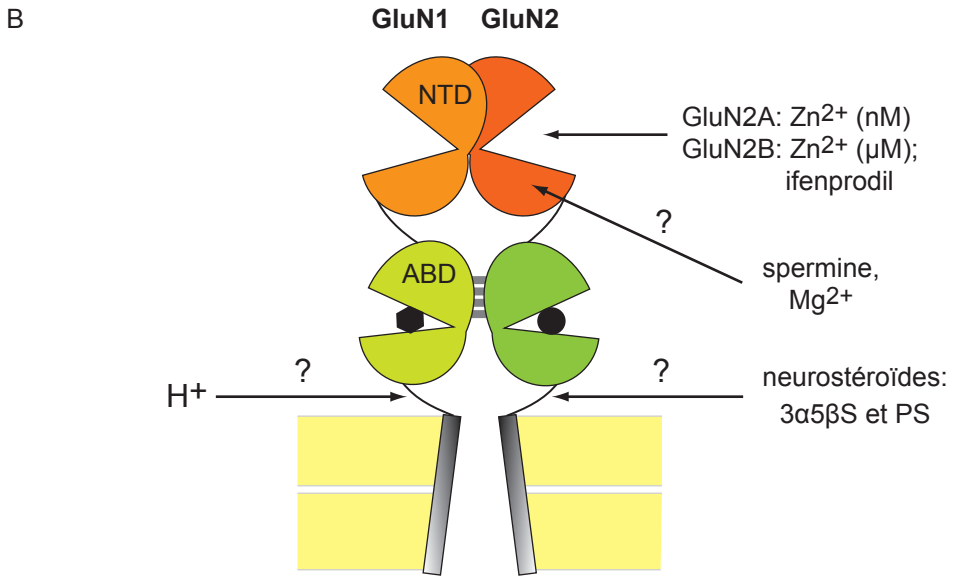


FIGURE 3.1 – Les récepteurs NMDA présentent de nombreux sites de régulation. A, Structures chimiques de certains modulateurs allostériques négatifs et positifs des récepteurs NMDA. Les composés modulant sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B sont notés en rouge. Cette figure a été adaptée de la revue de Mony et al. (2009a). B, Site d'action des différents modulateurs allostériques des récepteurs NMDA. À part pour les modulateurs se liant sur le NTD de la sous-unité GluN2, les sites de liaison des autres modulateurs allostériques sont inconnus. Leur localisation probable est indiquée par une flèche surmontée d'un point d'interrogation.

tains récepteurs comme les mGluRs, voir Chapitre 2, Section 2.1.2). Les poches de liaison des modulateurs allostériques, parce qu'elles ne touchent pas au coeur commun de fonctionnement des récepteurs, sont généralement moins conservées entre différents sous-types et permettent donc la conception de modulateurs spécifiques. Effectivement, dans le cas des récepteurs NMDA, les agonistes, antagonistes compétitifs et les bloqueurs du pore sont généralement peu sélectifs d'un sous-type de récepteur NMDA. Au contraire, les modulateurs allostériques présentent beaucoup plus de sélectivité (Paoletti and Neyton, 2007). En outre, certaines de ces molécules sont présentes de façon endogène dans le système nerveux central (zinc, protons) et peuvent moduler l'activité des récepteurs NMDA *in vivo*, augmentant encore plus leur diversité fonctionnelle. La richesse en sites de modulation allostérique des récepteurs NMDA est en accord avec leur rôle physiologique. En effet une hypo- ou une hyperactivation de ces récepteurs pouvant étant délétère pour les neurones (voir Chapitre 4), ces récepteurs nécessitent une régulation fine de leur activité.

3.1 Inhibition par les protons

Les récepteurs NMDA sont inhibés de façon physiologique par les protons extracellulaires. Les ions H^+ inhibent les récepteurs NMDA de façon non-compétitive et non dépendante du potentiel membranaire, indiquant que l'inhibition qu'ils provoquent ne passe ni par une dissociation des agonistes, ni par le blocage du canal ionique (Tang et al., 1990; Traynelis and Cull-Candy, 1990; Vyklicky et al., 1990). Une conséquence de l'inhibition par les protons est que l'acidification du milieu extracellulaire observée lors des phénomènes d'ischémie cérébrale minimise l'excitotoxicité induite par les récepteurs NMDA (voir Chapitre 4). La sensibilité des récepteurs NMDA aux protons est dépendante du type de sous-unités GluN1 et GluN2 qu'ils incorporent. Les récepteurs NMDA incorporant la sous-unité GluN2C sont les moins sensibles au pH, avec un pH d'IC_{50} d'environ 6,5 (Low et al., 2003). Les récepteurs contenant les sous-unités GluN1a et GluN2B ou GluN2D sont au contraire les plus sensibles aux protons extracellulaires avec un pH d'IC_{50} d'environ

7,4 (Traynelis et al., 1995; Low et al., 2003). Les récepteurs GluN1a/GluN2A ont quant à eux une sensibilité intermédiaire (lorsque le zinc contaminant est chélaté, pH d'$IC_{50} \simeq 7,0$; Low et al., 2003). Ainsi, à pH physiologique, les récepteurs NMDA sont inhibés environ pour moitié par les protons. Ceci a pour conséquence que de faibles variations de pH peuvent modifier de façon importante leur activité. Il a effectivement été montré que l'alcalinisation transitoire du milieu extracellulaire apparaissant lors de l'activité neuronale augmente l'activité des récepteurs NMDA synaptiques dans les cellules pyramidales de la partie CA1 de l'hippocampe (Makani and Chesler, 2007). La sensibilité aux protons est aussi modulée par l'épissage alternatif de la sous-unité GluN1. L'inclusion de l'exon 5 dans GluN1, une boucle surnuméraire située dans le lobe II du NTD de GluN1 (voir Chapitre 7, FIGURE 7.19, page 311), diminue la sensibilité au pH des récepteurs NMDA. Cet effet a été attribué à un "écrantage" du site de liaison des protons (qu'on appellera site protons) par les résidus chargés positivement présents sur la partie C-terminale de cette boucle (Traynelis et al., 1995). Il est intéressant de noter que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN1b avec les sous-unités GluN2A, GluN2B ou GluN2D ont tous la même sensibilité aux protons, avec un pH d'IC_{50} d'environ 6,7 (on note aussi que cette valeur de pH d'IC_{50} est également celle des récepteurs GluN1a/GluN2B en présence de 100 μM de spermine ; Traynelis et al., 1995 et voir plus bas).

Malgré de nombreuses études de mutagénèse dirigée (Traynelis et al., 1998; Masuko et al., 1999; Low et al., 2000, 2003), le site de liaison des protons (s'il est unique) reste indéterminé. Les résidus contrôlant la sensibilité aux protons sont dispersés dans la séquence protéique des sous-unités GluN1 et GluN2, mais ils se regroupent majoritairement dans deux régions adjacentes :

- l'hélice TM2 et plus particulièrement le motif "SYTANLAAF", qui contrôle l'ouverture et la fermeture du canal ionique (voir FIGURE 3.2) ;
- les segments reliant la partie S2 de l'ABD aux hélices TM2 et TM3.

Ces deux régions sont directement impliquées dans le mécanisme de transduction entre

A

```
                                TM1                                                  P
GluN1   T-LDSFMQPFQSTLWLLVGLSVHVVAVMLYLLDRFSPFGRFKVNSEEEEE-------DALTLSSAMWFSW 611
GluN2A  VSPSAFLEPFSASVWVMMFVMLLIVSAIAVFVFEYFSPVGYNRNLAKGKAPHG----PSFTIGKAIWLLW 609
GluN2B  VSPSAFLEPFSADVWVMMFVMLLIVSAVAVFVFEYFSPVGYNRCLADGREPGG----PSFTIGKAIWLLW 610
GluN2C  VSPSAFLEPYSPAVWVMMFVMCLTVVAITVFMFEYFSPVSYNQNLTKGKKPGG----PSFTIGKSVWLLW 607
GluN2D  VSPSAFLEPYSPAVWVMMFVMCLTVVAVTVFIFEYLSPVGYNRSLATGKRPGG----STFTIGKSIWLLW 634
GluA2   PGVFSFLDPLAYEIWMCIVFAYIGVSVVLFLVSRFSPYEWHSEEFEEGRDQTTSDQSNEFGIFNSLWFSL 581
KcsA    -----ALAWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPG-----------------AQLITYPRALWWSV 70

                                TM2
GluN1   GVLLNSGIGEGAPRSFSARILGMVWAGFAMIIVASYTANLAAFLVLDRPEERITGINDPRLRNPSD--- 677
GluN2A  GLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEFVDQVTGLSDKKFQRPHDYSP 678
GluN2B  GLVFNNSVPVQNPKGTTSKIMVSVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYVDQVSGLSDKKFQRPNDFSP 679
GluN2C  ALVFNNSVPIENPRGTTSKIMVLVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEQYIDTVSGLSDKKFQRPQDQYP 676
GluN2D  ALVFNNSVPVENPRGTTSKIMVLVWAFFAVIFLASYTANLAAFMIQEEYVDTVSGLSDRKFQRPQEQYP 703
GluA2   GAFMQQGCDIS-PRSLSGRIVGGVWWFFTLIIISSYTANLAAFLTVERMVSPIESAEDLAKQT------ 643
KcsA    ETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFVGREQERRGHFVRHSEKAAEEAYTR 139
```

B

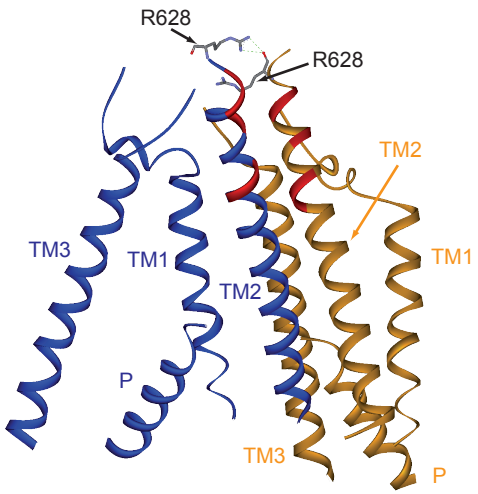


FIGURE 3.2 – Les résidus situés au niveau du motif SYTANLAAF contrôlent la sensibilité des récepteurs NMDA aux protons. A, Alignement des séquences de GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D avec celles de GluA2 (pdb : 3kg2) et KcsA (pdb : 1k4c). Les résidus prédits (GluN1, GluN2A-D ; www.predictprotein.org) ou connus (GluA2 et KcsA) pour appartenir à une hélice α sont colorés en rouge. Les résidus contrôlant la sensibilité aux protons des récepteurs NMDA (Low et al., 2003) et de KcsA (Thompson et al., 2008) sont mis en évidence par un rectangle bleu. B, Structure du canal ionique de la sous-unité GluA2 (pdb : 3kg2 ; Sobolevsky et al., 2009). Pour plus de clarté, seules deux sous-unités adjacentes sont représentées. Les codes couleurs pour les sous-unités sont les mêmes que dans la FIGURE 1.8, page 1.8. Les positions des résidus de l'hélice TM2 de GluN1 contrôlant la sensibilité au pH sont marquées en rouge. On remarque qu'ils sont tous situés sur une même face de l'hélice TM2. L'arginine R628 est représentée sous forme de bâtonnets. Elle fait des liaisons hydrogène (représentées par des pointillés verts) avec la sous-unité adjacente.

la liaison des agonistes dans les ABDs et l'ouverture/fermeture du canal. L'action des protons serait donc intimement couplée à la machinerie de transduction ("gating") des récepteurs NMDA.

Quel est le mécanisme par lequel les protons inhibent les récepteurs NMDA ? Sur les récepteurs AMPA, qui sont inhibés par les protons mais à des valeurs éloignées du pH physiologique (pH d'$IC_{50} \simeq 6.1$), il a été montré que l'acidification du milieu extracellulaire augmente la vitesse de désensibilisation de ces récepteurs, alors que le cyclothiazide, un composé abolissant la désensibilisation, diminue fortement la sensibilité au pH de ces récepteurs (Ihle and Patneau, 2000; Lei et al., 2001). Sur les récepteurs NMDA GluN1/GluN2A, Gielen et al. (2008) ont montré que des mutations déstabilisant l'interface de dimérisation entre ABDs augmentent fortement la sensibilité aux protons de ces récepteurs. L'état "interface de dimérisation ABD rompue" des récepteurs NMDA ayant été associé à un état de type "désensibilisé", il semblerait donc que les protons agissent selon un mécanisme commun parmi les iGluRs, en favorisant l'entrée des récepteurs dans l'état désensibilisé (voir le schéma d'activation des récepteurs NMDA en FIGURE 1.14, page 58). Des études d'électrophysiologie en canal unique sur des récepteurs GluN1/GluN2B suggèrent de plus que les protons agissent préférentiellement en stabilisant un état fermé plutôt qu'en déstabilisant un état ouvert du canal ionique (Banke et al., 2005).

Le canal ionique des iGluRs partage une homologie de séquence avec le canal potassique bactérien KcsA. KcsA est sensible à la concentration de protons intracellulaires, ne pouvant s'ouvrir que lorsque le pH est inférieur à 5,5. Thompson et al. (2008) ont montré que la sensibilité au pH de KcsA est contrôlée par quatre résidus situés à l'extrémité C-terminale de l'hélice TM2 (indiqués par des rectangles bleus dans la FIGURE 3.2A) qui maintiennent le canal fermé à pH $> 5,5$. D'après la structure cristallographique obtenue pour la sous-unité GluA2 (Sobolevsky et al., 2009), cette région correspond à la fin de l'hélice TM2 et au lien TM2-S2 chez les iGluRs. On note sur GluA2 la présence d'une arginine R628 en position équivalente à E118 dans KcsA. Dans la structure de GluA2 où le canal ionique

est fermé, cette arginine fait des liaisons hydrogène avec le groupement C=O peptidique de l'arginine 628 de la sous-unité adjacente (FIGURE 3.2). R628 joue un rôle prépondérant dans la désensibilisation des récepteurs AMPA, sa mutation en glutamate donnant lieu à des récepteurs qui ne désensibilisent pas (Yelshansky et al., 2004). Dans les récepteurs AMPA, R628 semble donc stabiliser l'état fermé du canal ionique. De façon intéressante, le residu correspondant dans GluN1 est aussi une arginine, R659 qui contrôle la sensibilité aux protons (Low et al., 2003). Dans le cadre d'une recherche du site de liaison des protons, il serait donc intéressant d'examiner plus en détail cette région.

La modification de la sensibilité au pH semble être un mécanisme commun à de nombreux modulateurs allostériques des récepteurs NMDA. L'ifenprodil, le zinc et les polyamines, ainsi que l'exon 5, considéré comme un ligand interne au récepteur, modulent l'activité des récepteurs NMDA en modifiant en aval le pKA du site protons (Traynelis et al., 1995; Pahk and Williams, 1997; Mott et al., 1998; Traynelis et al., 1998; Low et al., 2000, 2003). Ces données renforcent donc l'hypothèse que le site proton est intimement couplé à la machinerie de transduction ("gating") des récepteurs NMDA.

3.2 Les modulateurs se liant dans la région N-terminale des récepteurs NMDA

Le NTD de la sous-unité GluN2 est le site de modulation allostérique le mieux connu jusqu'à présent. Ce domaine, constitué de deux lobes reliés par une charnière, appartient à la famille LIVBP, famille dont les propriétés ont été largement étudiées à partir des années 1980 (voir Chapitre 2). Au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont révélé que les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B peuvent former des sites de liaison sélectifs pour des antagonistes non-compétitifs (modulateurs allostériques négatifs).

3.2.1 Inhibition par le zinc des récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B

Les premières expériences sur le zinc ont montré que ce cation est capable d'inhiber de façon non dépendante du potentiel transmembranaire les récepteurs NMDA natifs de neurones hippocampaux (Peters et al., 1987; Westbrook and Mayer, 1987). Plus tard, il a été établi que le zinc pouvait inhiber les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D (Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1998; Choi and Lipton, 1999; Fayyazuddin et al., 2000; Low et al., 2000; Paoletti et al., 2000; Low et al., 2003; Rachline et al., 2005 et voir FIGURE 3.3A). La sensibilité au zinc des différents sous-types de récepteurs NMDA est cependant différente, les récepteurs contenant GluN2A présentant une très forte affinité pour le zinc ($IC_{50} \simeq 20\,nM$; Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1998), alors que les récepteurs GluN1/GluN2B présentent une affinité "intermédiaire" pour le zinc ($IC_{50} \simeq 1\,\mu M$; Paoletti et al., 1997; Traynelis et al., 1998; Rachline et al., 2005). La sensibilité pour le zinc des récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D est beaucoup plus faible, de l'ordre de la dizaine de micromolaires (Rachline et al., 2005). Seuls les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B forment un site de liaison pour le zinc (Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005). L'inhibition à plus faible affinité vue sur les récepteurs GluN1/GluN2C et GluN1/GluN2D, qu'on observe aussi sur les récepteurs contenant GluN2A et GluN2B lorsqu'on détruit le site de liaison à haute affinité, provient de la fixation du zinc sur un site inconnu, distinct du NTD et du pore (Rachline et al., 2005).

De nombreuses études de mutagénèse dirigée, de biochimie et de modélisation moléculaire ont permis proposer que le zinc se fixe dans la crevasse interlobaire du NTD des sous-unités GluN2A et GluN2B et qu'il interagit avec des résidus des lobes I et II (Choi and Lipton, 1999; Fayyazuddin et al., 2000; Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005). Il a ainsi été supposé que le zinc, en se liant, induit la fermeture du NTD, selon un mécanisme commun aux protéines de la famille LIVBP (Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005).

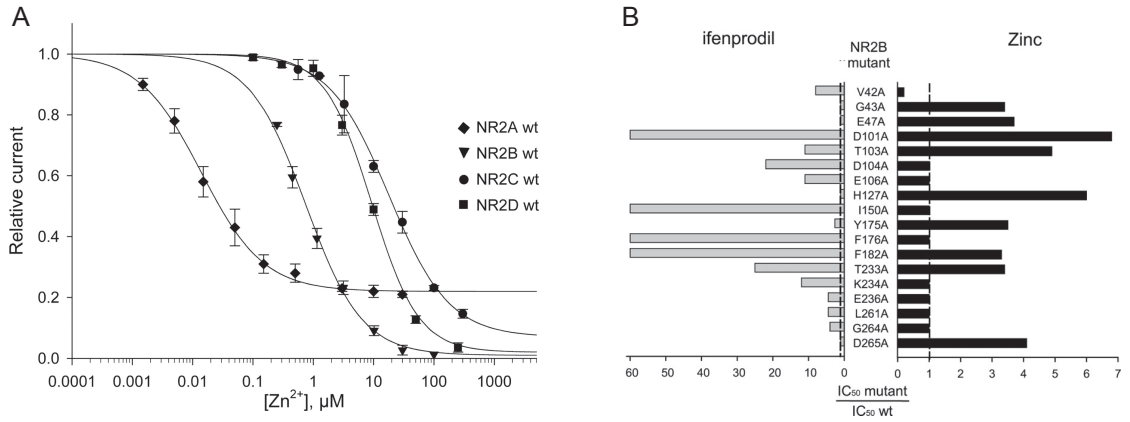


FIGURE 3.3 – La sensibilité des récepteurs NMDA pour le zinc dépend du type de sous-unité GluN2. D'après Rachline et al. (2005). A, Courbes dose-réponse du zinc pour les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A, GluN2B, GluN2C et GluN2D. Courbes-dose réponse obtenues sur des récepteurs NMDA recombinants exprimés en ovocyte de Xénope à un potentiel de +50 mV pour supprimer l'effet inhibiteur dépendant du potentiel membranaire du zinc. B, Effets des mutations en alanine de différents résidus prédits pour être localisés à l'intérieur de la fente interlobaire du NTD de GluN2B.

Malgré ces nombreuses études, les sites de liaison du zinc dans les NTDs de GluN2A et GluN2B ont longtemps été imprécis à cause d'un manque de structures tridimensionnelles à haute résolution. La structure cristallographique récemment publiée du NTD de GluN2B a clarifié le mode de liaison du zinc dans la sous-unité GluN2B (Karakas et al., 2009). Cette structure confirme tout d'abord que le zinc se fixe dans une forme fermée du NTD, à l'intérieur de la fente interlobaire. Dans la structure cristallographique, le zinc se situe au centre d'un tétraèdre déformé composé de H127 et E47 au lobe I, et D265 et E284 au lobe II (FIGURE 3.4). H127, E47 et D265 avaient été identifiés auparavant et prédits comme résidus contrôlant la sensibilité pour le zinc sur la sous-unité GluN2B (Rachline et al., 2005 et FIGURE 3.3B). E284 est un résidu nouvellement mis en évidence grâce à la structure cristallographique du NTD de GluN2B. En effet, la structure fermée du NTD de GluN2B présentant une importante torsion entre les deux lobes qui n'existe chez aucune autre protéine de la famille LIVBP (voir Chapitre 2, Section 2.3.2), sa positition était radicalement différente dans les modèles par homologie qui avaient été générés auparavant (Perin-Dureau et al., 2002; Malherbe et al., 2003; Mony et al., 2009b). La mutation de E284

en alanine diminue la sensibilité au zinc d'un facteur comparable à la mutation H127A, ce qui confirme les résultats obtenus par cristallographie aux rayons X (Karakas et al., 2009). De façon étonnante, dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B, seuls deux résidus, H127 et E284, contactent directement l'ion Zn^{2+} (FIGURE 3.4). Les résidus E47 et D265 sont beaucoup plus éloignés, à une distance d'environ 6 Å du zinc. Pourtant, les sites de coordination du zinc comprennent généralement au moins quatre ligands, dont la distance avec le cation est d'environ 2 Å (Alberts et al., 1998). Il est possible que E47 et D265 contactent le zinc par le biais d'une molécule d'eau labile, qui ne serait pas visible sur la structure cristallographique.

À quoi ressemble le site de liaison du zinc dans le NTD de GluN2A ? Des expériences de mutagénèse dirigée ont montré que la plupart des résidus contrôlant la sensibilité au zinc des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A se situent à des positions équivalentes à ceux contrôlant la sensibilité au zinc dans les récepteurs GluN1/GluN2B (Fayyazuddin et al., 2000; Paoletti et al., 2000 et voir alignement 1). Le zinc est donc susceptible de partager un site de liaison similaire dans le NTD de GluN2A, site qui contiendrait les résidus H44, H128 et E266 (équivalents de E47, H127 et D265 dans GluN2B). Des travaux non publiés au laboratoire ont en outre montré que la mutation en alanine de GluN2A-D283, le résidu correspondant à GluN2B-E284, diminue fortement la sensibilité au zinc des récepteurs GluN1/GluN2A (effet similaire à la mutation H128S, la mutation la plus forte sur GluN2A ; Paoletti et al., 2000). Le phénomène de torsion est donc vraisemblablement conservé dans le NTD de GluN2A, et il est fort probable que comme pour GluN2B, le zinc soit directement coordiné par H128 et D283 de façon intime. D'où vient alors la différence d'affinité des sous-unités GluN2A et GluN2B pour le zinc ? La première différence d'affinité entre GluN2A et GluN2B vient très certainement du fait que le résidu équivalent à GluN2B-E47 est une histidine, GluN2A-H44. Les histidines sont connues pour se lier avec une plus forte affinité aux ions Zn^{2+} (Alberts et al., 1998). De plus, les boucles β1-α1, contenant GluN2A-H44 et GluN2B-E47, et β9-β10, contenant GluN2A-E266 et

GluN2B-D265, étant différentes dans les NTDs de GluN2A et GluN2B (voir alignement 1), il est possible que, dans GluN2A, H44 et D266 soient arrangés de façon à faire des liaison plus fortes avec le zinc. Enfin, les résidus appartenant à la deuxième sphère de coordination du zinc jouent certainement aussi un rôle important dans la détermination des différences d'affinité entre GluN2A et GluN2B.

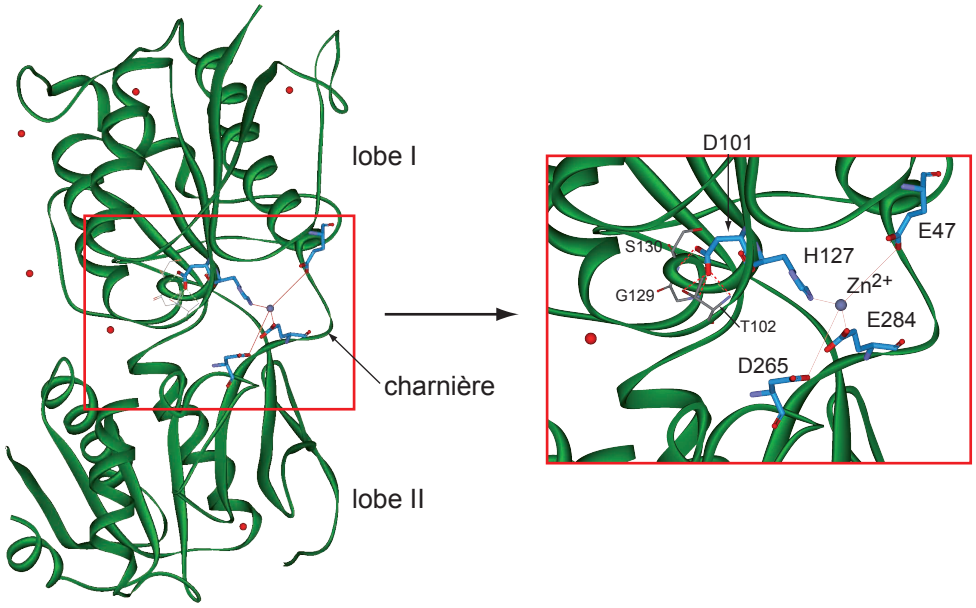


FIGURE 3.4 – Structure du site de liaison du zinc dans le NTD de GluN2B (pdb : 3jpy). La structure du NTD est représentée en vert sous forme de rubans. Les molécules d'eau sont représentées par des sphères rouges, le zinc par une sphère grise. Les résidus participant au site de liaison du zinc sont représentés sous forme de bâtonnets dont les atomes de carbone sont colorés en bleu. Les autres atomes sont représentés selon les couleurs conventionnelles. On note que D101 n'interagit pas directement avec le zinc mais qu'il maintient la structure de la boucle $\beta 3$-$\alpha 3$ en faisant des liaisons hydrogènes (symbolisées par des traits pointillés rouges) avec les résidus T102, G129 et S130.

Grâce à la différence d'affinité pour le zinc des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, l'application d'une concentration nanomolaire de zinc (jusqu'à $\sim$ 300 nM), permet d'inhiber sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A (Neyton and Paoletti, 2006). Cette propriété a d'ailleurs été utilisée pour distinguer différents sous-types de récepteurs NMDA dans des expériences physiologiques (Bidoret et al., 2009). De plus, le zinc est concentré et libéré à de nombreuses synapses

glutamatergiques du système nerveux central (Paoletti et al., 2009). Il est donc susceptible de moduler l'activité des récepteurs NMDA de façon endogène. Cependant, la régulation *in vivo* des récepteurs NMDA par le zinc n'a pas encore été clairement démontrée. En effet, même s'il est connu que des ions Zn^{2+} sont libérés en même temps que le glutamate lors de l'exocytose, les niveaux de concentration de zinc dans le milieu extracellulaire sont encore inconnus (Paoletti et al., 2009). De plus, à cause de leur affinité nanomolaire pour le zinc, il est possible que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A soient inhibés de façon tonique, et pas seulement lors d'une activité synaptique (Paoletti et al., 2009).

3.2.2 L'ifenprodil, un composé organique ciblant sélectivement la sous-unité GluN2B

L'ifenprodil (FIGURE 3.1A) et ses dérivés représentent une importante famille de composés organiques de synthèse inhibibant sélectivement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Williams, 1993). L'ifenprodil était utilisé à l'origine pour ses propriétés vasodilatatrices (Carron et al., 1971). Plus tard, on a découvert que ce composé exerçait une action neuroprotectrice par le biais de l'inhibition des récepteurs NMDA (Carter et al., 1988). L'ifenprodil inhibe les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B avec une affinité ~ 500 fois supérieure ($IC_{50} \simeq 0,2\,\mu M$) à celle ces récepteurs contenant la sous-unité GluN2A (Williams, 1993). L'inhibition qu'il provoque ne dépend pas du potentiel membranaire et est non compétitive, même si la fixation de l'ifenprodil entraîne une diminution de l'affinité pour la glycine et une augmentation de l'affinité pour le glutamate (Williams, 1993; Kew et al., 1996). Cette forte sélectivité envers un seul sous-type de récepteurs NMDA (si l'on exclut les trihétéromères GluN1/GluN2A/GluN2B ; Hatton and Paoletti, 2005) a fait de l'ifenprodil et de ses dérivés des outils pharmacologiques extrêmement puissants pour l'étude physiologique des récepteurs NMDA (Neyton and Paoletti, 2006; Paoletti and Neyton, 2007). Ces composés se sont aussi révélés prometteurs

pour le traitement de certains troubles neurologiques (voir Chapitre suivant).

Des expériences sur des NTDs isolés en solution et sur des récepteurs contenant des sous-unités chimériques GluN2A/GluN2B ont montré que l'ifenprodil se lie au NTD de la sous-unité GluN2B (Gallagher et al., 1996; Perin-Dureau et al., 2002; Wong et al., 2005; Ng et al., 2007; Han et al., 2008 et voir FIGURE 3.5). De plus, grâce à des études de mutagénèse sur récepteur entier et NTD isolé (Perin-Dureau et al., 2002; Ng et al., 2008; Mony et al., 2009b), il a été proposé que l'ifenprodil, de la même manière que le zinc, se lie dans la fente interlobaire du NTD de GluN2B et induit la fermeture du domaine (voir FIGURE 3.3B pour les résidus contrôlant la sensibilité pour l'ifenprodil). Le zinc et l'ifenprodil agissent de manière compétitive pour la liaison au NTD de GluN2B, mais leurs sites de liaison ne se superposent que partiellement (Rachline et al., 2005 et voir FIGURE 3.3 pour une comparaison des résidus contrôlant les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil).

Certaines données de la littérature suggèrent que le site de liaison de l'ifenprodil ne serait pas entièrement contenu dans le NTD de GluN2B, mais que le NTD de la sous-unité GluN1 pourrait aussi y participer. Ainsi, Han et al. (2008) ont montré que des NTDs isolés des sous-unités GluN1 et GluN2B (mais pas GluN2A) pouvaient lier l'ifenprodil radiomarqué avec des constantes de dissociation de $0,18\,\mu$M pour le NTD de GluN1 et de $0,21\,\mu$M pour le NTD de GluN2B (la valeur de K_d pour GluN2B est en accord avec les valeurs d'IC_{50} déterminées par électrophysiologie, voir plus haut). De plus, la mutation de certains acides aminés de la sous-unité GluN1 affecte la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B (Masuko et al., 1999). Cependant, ces résidus se situent majoritairement au niveau de l'hélice $\alpha 3$ du NTD de GluN1, hélice impliquée dans l'interface de dimérisation des protéines de la famille LIVBP (voir Perin-Dureau et al., 2002 et Chapitre 2, Section 2.2, page 76). Ces résidus ne seraient donc pas directement impliqués dans la liaison de l'ifenprodil, mais plutôt dans la transduction des changements conformationnels induits par l'ifenprodil. Les autres résidus mis en évidence par Masuko et al. (1999) sur le NTD de GluN1, notamment l'aspartate D130, sont situés dans la boucle $\beta 4$-$\beta 5$, qui

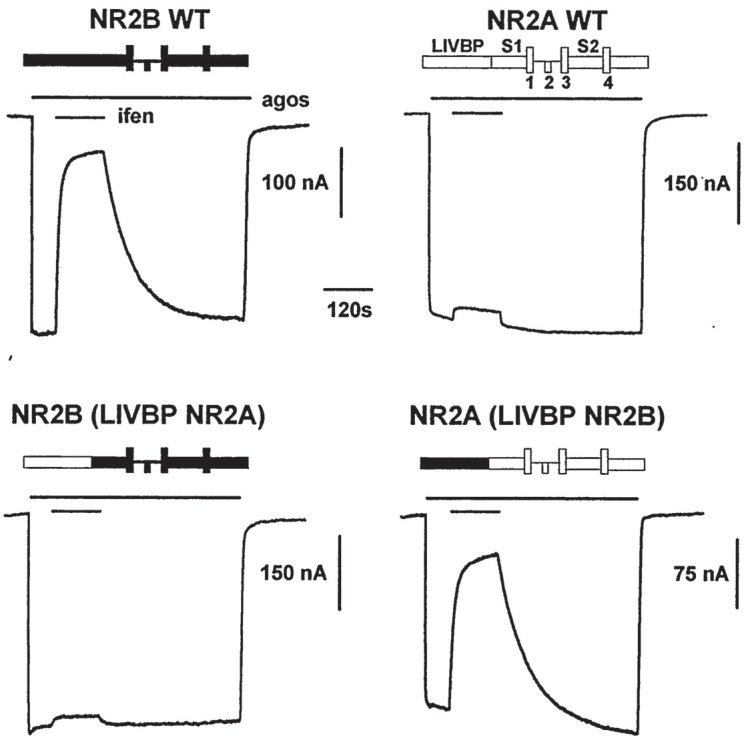


FIGURE 3.5 – Le NTD de la sous-unité GluN2B contrôle la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs NMDA : l'échange des NTDs entre les sous-unités GluN2A et GluN2B permet l'échange des sensibilités à l'ifenprodil. Chaque trace montre l'inhibition par 1 μM d'ifenprodil du courant évoqué par les agonistes (agos : glutamate et glycine, chacun appliqués à 100 μM). D'après Perin-Dureau et al. (2002).

correspond à la "boucle 1" des récepteurs AMPA et kainate (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009). Dans les dimères de NTDs des récepteurs AMPA et kainate, cette boucle se projette dans l'espace interlobaire de la sous-unité adjacente (voir Chapitre 2, FIGURE 2.9, page 88). À supposer que les NTDs des récepteurs NMDA forment des hétérodimères GluN1/GluN2B adoptant une organisation similaire aux NTDs des récepteurs AMPA et kainate, il est possible que l'ifenprodil, en se fixant dans la crevasse interlobaire du NTD de la sous-unité GluN2B, puisse interagir avec les résidus de la boucle β4-β5. Ceci pourrait ainsi expliquer pourquoi les NTDs isolés de GluN1 peuvent lier l'ifenprodil (Han et al., 2008).

3.2.3 Mécanisme d'action des composés se liant dans le NTD des récepteurs NMDA

La cascade de transduction permettant à une molécule se liant sur le NTD de la sous-unité GluN2 d'induire l'inhibition du récepteur, c'est-à-dire la fermeture du canal ionique a été disséquée dans le cas du zinc pour les récepteurs GluN1/GluN2A (Gielen et al., 2008). Ce mécanisme a été décrit dans le Chapitre 1, Section 1.3.2 à la page 57. En bref, le zinc se lie dans le NTD de GluN2A et induit sa fermeture. Cette fermeture exerce une tension sur les segments reliant les NTDs aux ABDs, ce qui provoque une rupture de l'interface de dimérisation entre ABDs. Ceci a pour conséquence la relaxation des liens entre les ABDs et les hélices transmembranaires et la fermeture du canal ionique (voir FIGURE 1.14, page 1.14). Les récepteurs sont alors dans un état de type "désensibilisé". On pense de plus que la fermeture du canal suite au réarrangement de l'interface de dimérisation nécessite la liaison de protons (voir plus haut, Section 3.1), ce qui se traduit par le fait qu'à pH alcalin, le zinc n'induit pas ou peu d'inhibition des récepteurs GluN1/GluN2A (Low et al., 2000). À l'inverse, la fixation du zinc induit une augmentation du pKa du "site protons" des récepteurs GluN1/GluN2A (Choi and Lipton, 1999; Low et al., 2000).

Le mécanisme d'inhibition par les ligands du NTD des récepteurs GluN1/GluN2B est

probablement similaire. En effet, Gielen et al. (2009) ont proposé que, de façon générale, les récepteurs NMDA oscillent entre un état actif et un état "désensibilisé", la fermeture du NTD de la sous-unité GluN2 favorisant l'état "désensibilisé" (voir Chapitre 1, Section 1.3.2). Le fait que l'inhibition par l'ifenprodil passe aussi par une augmentation de la sensibilité aux protons des récepteurs GluN1/GluN2B renforce cette proposition (Pahk and Williams, 1997; Mott et al., 1998). Il existe par contre une controverse concernant le mécanisme d'inhibition des récepteurs GluN1/GluN2B par le zinc. Certains groupes disent que l'inhibition par le zinc est indépendante du pH (Traynelis et al., 1998; Low et al., 2000) et d'autres affirment le contraire (Choi and Lipton, 1999). Cependant, le même groupe qui affirme que l'inhibition par le zinc des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B n'induit pas de modification de la sensibilité aux protons montre aussi que des mutations éloignées du site de liaison du zinc qui diminuent la sensibilité aux protons des récepteurs GluN1/GluN2B diminuent aussi la sensibilité au zinc de ces récepteurs, et vice versa. Ceci, ajouté au fait que le zinc et l'ifenprodil partagent le même site de liaison, laisse à penser que l'inhibition allostérique par les ligands du NTD passe par le même mécanisme chez les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B. Néanmoins, la dépendance au pH de l'inhibition par le zinc (mais aussi par l'ifenprodil) semble être plus faible pour les récepteurs NMDA contenant GluN2B, ce qui pourrait s'expliquer par la plus forte sensibilité intrinsèque des récepteurs GluN1/GluN2B aux protons.

3.3 Modulation allostérique positive par les polyamines

Les polyamines sont des polybases aliphatiques chargées positivement à pH physiologique. Les polyamines endogènes (putrescine, spermidine et spermine) sont essentiellement formées à partir de la décarboxylation de l'ornithine, un composant du cycle de l'urée, grâce à une enzyme, l"'ornithine decarboxylase" (Figure 3.6). La spermidine et la spermine peuvent aussi être synthétisées à partir de la décarboxylation de la (S)-adénosylméthionine (Rock and Macdonald, 1995; Igarashi and Kashiwagi, 2010). Les polyamines endogènes

jouent un rôle très important dans les processus de synthèse de protéines et de division et de croissance cellulaires. Elles sont présentes en grande quantité dans le milieu intracellulaire (environ 1 mM dans le foie de rat ; Igarashi and Kashiwagi, 2010). Elles interagissent majoritairement avec l'ARN, mais elles peuvent aussi se lier à l'ADN, aux nucléotides triphosphates et aux phospholipides (Igarashi and Kashiwagi, 2010). Dans le système nerveux central, elles inhibent aussi certains canaux ioniques tels que les canaux potassium "inward rectifier" et les récepteurs AMPA et kainate non édités pour leur site Q/R/N (Bowie and Mayer, 1995; Williams, 1997). À potentiel dépolarisé, les polyamines intracellulaires, attirées par le potentiel extracellulaire négatif, entrent à l'intérieur des canaux ioniques des canaux potassium ou des récepteurs AMPA et kainate et empêchent le passage des ions. C'est le phénomène d"'inward rectification". Les récepteurs NMDA présentent quant à eux une modulation par les polyamines extracellulaires.

Les polyamines extracellulaires produisent différents effets sur les récepteurs NMDA (Rock and Macdonald, 1995; Williams, 1997; Igarashi and Kashiwagi, 2010). Les premières études sur des récepteurs NMDA natifs de neurones hippocampaux en culture ont mis en évidence que les polyamines produisaient des effets différents en fonction de la cellule examinée, allant de la potentiation à l'inhibition des courants ou de la liaison du MK801 radiomarqué (Ransom and Stec, 1988; Williams et al., 1989; Benveniste and Mayer, 1993 et voir FIGURE 3.7). Depuis, il a été établi que les différences d'effets observées correspondent à des niveaux d'expression variables des différents sous-types de récepteurs NMDA dans chaque cellule, ainsi qu'à une multiplicité d'actions produites par les polyamines.

La spermine (et la spermidine) produit trois effets distincts sur les récepteurs NMDA :

- une inhibition dépendante du potentiel transmembranaire ;
- une potentialisation dépendante de la concentration en glycine ;
- une potentialisation indépendante de la concentration en glycine et indépendante du potentiel transmembranaire.

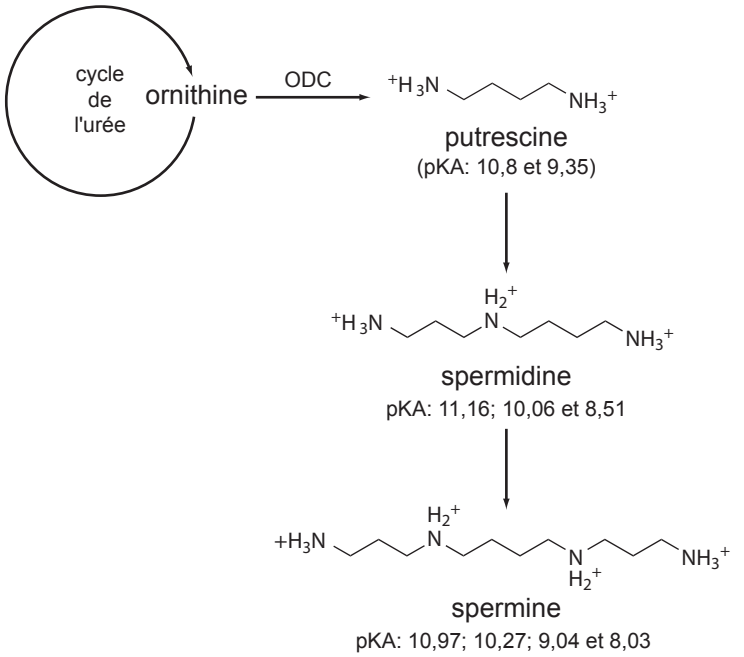


FIGURE 3.6 – Métabolisme des polyamines. Les polyamines sont essentiellement synthétisées à partir de l'onithine grâce à l'enzyme "ornithine decarboxylase" (ODC). D'après Rock and Macdonald (1995) et Igarashi and Kashiwagi (2010). Les pKa de la putrescine sont issus de Rock and Macdonald (1995). Les pKa de la spermidine et de la spermine sont issus de Takeda et al. (1983)

.

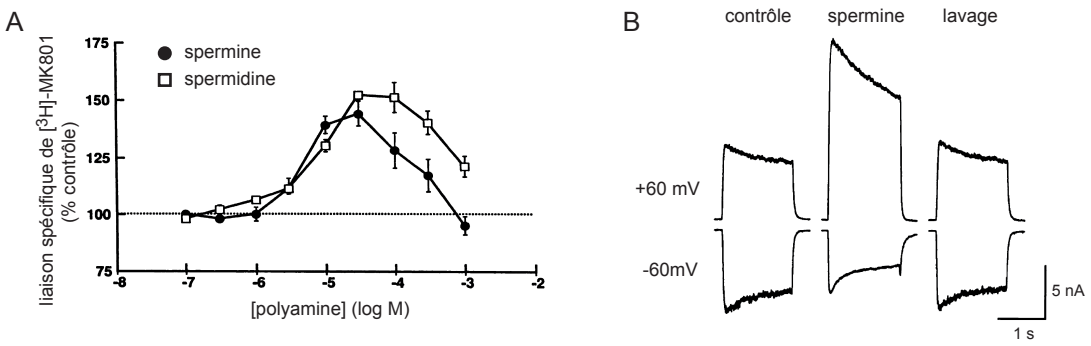


FIGURE 3.7 – Effets inhibiteur et potentialisateur des polyamines sur les récepteurs NMDA. A, Effets de la spermine et de la spermidine sur la liaison du $[^3H]$-MK801 dans des préparations de membranes plasmiques synaptiques issues de cerveaux de rats. Tous les échantillons contenaient 100 μM de glutamate et de glycine. D'après Williams et al. (1989). B, Traces de courant en cellule entière mesurées sur des neurones hippocampaux de rat suite à une application de 100 μM de NMDA à des potentiels de membrane de -60 mV et $+60$ mV. La glycine est présente dans le bain à une concentration de 10 μM. Le NMDA a été appliqué soit seul (traces "contrôle" et "lavage"), soit en présence de 3 mM de spermine. D'après Benveniste and Mayer (1993).

3.3.1 L'inhibition dépendante du potentiel transmembranaire

L'inhibition dépendante du potentiel transmembranaire est due à l'entrée de la spermine dans le canal ionique, et à son occlusion, selon un mécanisme similaire au blocage par le magnésium (Rock and MacDonald, 1992). La sensibilité des récepteurs NMDA au blocage par les polyamines dépend beaucoup du potentiel transmembranaire, avec des valeurs d'IC_{50} de 350 μM à -60 mV et de 27 mM à 0 mV (valeurs mesurées sur des neurones hippocampaux en culture ; Benveniste and Mayer, 1993 et FIGURE 3.7B). Cependant, contrairement au magnésium, la spermine peut traverser le canal ionique à des potentiels très hyperpolarisés (Araneda et al., 1999). Le blocage par les polyamines a la même sélectivité entre sous-unités que le blocage par le magnésium, les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D étant moins inhibés que les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B (ces derniers ayant le même degré d'inhibition ; Williams et al., 1994; Williams, 1995). Enfin, des mutations au site Q/R/N qui suppriment le blocage par le magnésium suppriment aussi le blocage par la spermine, indiquant que ces deux composés partagent un site de liaison situé profondément dans le pore (Kashiwagi et al., 1997).

3.3.2 La potentialisation dépendante de la glycine

Les polyamines peuvent augmenter l'activité des récepteurs NMDA en augmentant leur sensibilité apparente pour la glycine (potentialisation dépendante de la glycine). Ceci se traduit par le fait que la potentialisation des réponses NMDA par la spermine est plus importante en présence de faibles concentrations de glycine (McGurk et al., 1990). En présence de 1 mM de spermine, l'affinité apparente pour la glycine est augmentée d'un facteur 3,5 environ (Benveniste and Mayer, 1993). La potentialisation dépendante de la glycine s'exerce sur les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, mais pas les sous-unités GluN2C et GluN2D (Williams et al., 1994; Zhang et al., 1994; Williams, 1995). Par contre, contrairement à la potentialisation indépendante de la glycine et du po-

tentiel transmembranaire (voir plus bas), elle ne dépend pas du type de variant d'épissage de la sous-unité GluN1 (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994). Le site de liaison de la spermine permettant la potentialisation dépendante de la glycine des récepteurs NMDA n'a pas encore été déterminé, mais il pourrait se situer sur la sous-unité GluN1 qui comporte le site de liaison de la glycine. Cependant, Han et al. (2008) ont montré que la spermine est aussi capable de se lier aux domaines N-terminaux isolés en solution des sous-unités GluN2A et GluN2B avec des valeurs de constantes de dissosciation compatibles avec les EC_{50} de la spermine produisant l'effet de potentialisation dépendante de la glycine. Ils proposent alors que ce site pourrait se situer sur les NTDs des sous-unités GluN2. Dans les conditions physiologiques, il est possible que ce site soit partiellement occupé par les ions Ca^{2+} ou Mg^{2+} car des concentrations millimolaires des deux cations augmentent aussi la sensibilité des récepteurs NMDA pour la glycine (Wang and MacDonald, 1995; Paoletti et al., 1995).

3.3.3 La potentialisation indépendante de la glycine et indépendante du potentiel transmembranaire

Le troisième effet des polyamines est une potentialisation indépendante du potentiel et indépendante de la glycine, car elle peut être observée à potentiel dépolarisé et en présence d'une quantité saturante de glycine (McGurk et al., 1990; Benveniste and Mayer, 1993 et Figure 3.7). À pH physiologique (pH = 7,3), la spermine potentialise l'activité des récepteurs NMDA avec une EC_{50} d'environ 150 μM et une potentialisation maximale d'un facteur 3 environ (Benveniste and Mayer, 1993). De façon remarquable, ce type de potentialisation s'exerce uniquement sur les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Williams et al., 1994). La potentialisation indépendante du potentiel et de la glycine est aussi influencée par la sous-unité GluN1, l'insertion de l'exon 5 supprimant la sensibilité à la spermine des récepteurs GluN1b/GluN2B (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994). La suppression de la sensibilité à la spermine par l'insertion de

l'exon 5 est probablement due à deux aspects. Premièrement, l'exon 5 diminue la sensibilité des récepteurs NMDA aux protons, ce qui en retour diminue la sensibilité à la spermine (Traynelis et al., 1995 et voir ci-dessous). De plus, il a été proposé que l'exon 5 et la spermine sont en compétition pour le même site de liaison, les charges positives contenues dans l'exon 5 repoussant la spermine et l'empêchant de se fixer dans son site de liaison (Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995).

De nombreuses études sur des récepteurs recombinants GluN1a/GluN2B ont montré que la spermine exerçait sont effet potentialisateur en diminuant la sensibilité aux protons des récepteurs NMDA (Traynelis et al., 1995, 1998). Ainsi, chez les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, on observe une forte corrélation entre la sensibilité aux protons et la sensibilité à la spermine (Traynelis et al., 1995, 1998). On notera de façon intéressante que la spermine extracellulaire est aussi capable de potentialiser les récepteurs kainate selon un mécanisme similaire, c'est-à-dire en diminuant le pKA du "site protons" de ces récepteurs (Mott et al., 2003). Chez les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, la présence de spermine diminue aussi les affinités apparentes pour le zinc et l'ifenprodil (Carter et al., 1990; Traynelis et al., 1998). Pour cette raison, on a longtemps pensé que l'ifenprodil et la spermine partageaient le même site de liaison. Grâce à des études cinétiques, Kew and Kemp (1998) ont cependant montré que la spermine et l'ifenprodil ne sont pas compétitifs, mais qu'ils exercent un effet allostérique négatif l'un sur l'autre.

Bien que de nombreuses mutations modifient la sensibilité à la spermine des récepteurs GluN1/GluN2B, le site de liaison de la spermine permettant la potentialisation indépendante du potentiel et de la glycine est encore indéterminé. Les résidus qui ont été mutés sont essentiellement des résidus chargés négativement (glutamates et aspartates) car ils sont susceptibles de former des liaisons ioniques avec la spermine chargée positivement, comme cela a lieu dans les protéines bactériennes périplasmiques chargées du transport des polyamines chez les bactéries gram$^-$ (par exemple, la protéine PotD ; Sugiyama et al.,

1996a,b; Kashiwagi et al., 1996b). Les résidus contrôlant la sensibilité à la spermine sont localisés à la fois sur les sous-unités GluN1 et GluN2B et sont dispersés le long des deux séquences protéiques (Williams et al., 1995; Kashiwagi et al., 1996a; Gallagher et al., 1997; Masuko et al., 1999). Les mutations qui affectent la sensibilité à la spermine affectent pour la plupart aussi la sensibilité aux protons (Traynelis et al., 1995; Williams et al., 1995; Kashiwagi et al., 1996a; Masuko et al., 1999). Par conséquent, il est difficile de savoir si ces mutations modifient directement la sensibilité à la spermine, en perturbant son site de liaison, ou indirectement en perturbant la sensibilité aux protons du récepteur. Néanmoins, certains travaux penchent en faveur d'un site de liaison de la spermine au niveau des NTDs des sous-unités GluN1 et GluN2B (Gallagher et al., 1997; Masuko et al., 1999; Huggins and Grant, 2005; Han et al., 2008). En effet, Masuko et al. (1999) ont montré qu'il existe des agrégats de résidus acides contrôlant la sensibilité à la spermine des récepteurs GluN1/GluN2B situés dans les lobes II des NTDs des sous-unités GluN1 et GluN2B, dans une région située à proximité de l'exon 5 pour la sous-unité GluN1. De plus, Han et al. (2008) ont montré que les NTDs des sous-unités GluN1 et GluN2B (mais aussi celui de GluN2A, voir plus haut) sont capables de lier la spermine. La localisation du site de liaison de la spermine reste cependant à établir formellement. De plus, son mécanisme d'action et l'origine de sa sélectivité pour les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B restent indéterminés à ce jour.

3.3.4 Pertinence physiologique de la potentialisation des récepteurs NMDA par les polyamines

Les polyamines sont-elles des ligands endogènes des récepteurs NMDA ? Nous avons dit précédemment que les polyamines sont présentes en grande quantité dans le milieu intracellulaire. Au contraire, les concentrations de polyamines dans l'espace extracellulaire sont probablement faibles dans les conditions physiologiques ($< 200\,\text{nM}$ dans le liquide cérébrospinal ; Shaw and Pateman, 1973). Cependant, différents éléments laissent penser

que les polyamines peuvent être présentes dans le milieu extracellulaire sous certaines conditions. Tout d'abord, la spermine et la spermidine peuvent être libérées de façon dépendante du calcium lors de la dépolarisation des neurones (Harman and Shaw, 1981b). De même, il a été montré que l'activation des récepteurs NMDA entraîne la libération de spermine dans le milieu extracellulaire (Fage et al., 1992). Enfin, des systèmes de recapture active des polyamines ont été mis en évidence dans le cortex cérébral de rat (Harman and Shaw, 1981a). Ces éléments indiquent donc que les polyamines pourraient agir comme des neuromodulateurs dans le milieu extracellulaire et modifier l'activité des récepteurs NMDA *in vivo*. Enfin, le magnésium (mais pas le calcium) est aussi capable d'exercer un effet potentialisateur indépendant de la glycine et du potentiel transmembranaire sur les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, suggérant un site de liaison commun pour la spermine et le magnésium (Paoletti et al., 1995; Kew and Kemp, 1998). Avec une EC_{50} d'environ 2 mM, une concentration proche des niveaux physiologiques de magnésium, le site de potentialisation de la spermine est susceptible d'être occupé en partie par des ions Mg^{2+} dans les conditions physiologiques.

Si la pertinence physiologique de la modulation des récepteurs NMDA par la spermine n'est pas complètement établie, l'étude du site de liaison et du mécanisme d'action de la spermine permettant la potentialisation indépendante de la glycine et du potentiel présente un intérêt pharmacologique indéniable. En effet, aucun mécanisme de modulation allostérique positive n'a encore été décrit pour les récepteurs NMDA. De plus, il a été établi que certaines pathologies comme la schizophrénie sont liées à une hypoactivation des récepteurs NMDA (voir Chapitre 4, Section 4.3.1). Mieux comprendre le mécanisme d'action des polyamines permettrait de concevoir de nouvelles stratégies pour contrer les effets nocifs liés à une sous-activation des récepteurs NMDA.

3.4 Les neurostéroïdes : des modulateurs positifs et négatifs

La plupart des stéroïdes ont une action hormonale, étant synthétisés par des tissus glandulaires et libérés dans la circulation générale. Les stéroïdes diffusent à travers les membranes et se lient à des récepteurs intracellulaires, qui à leur tour interagissent avec des facteurs de transcription qui induisent ou répriment l'expression de certains gènes. Parce que leur mode d'action nécessite l'activation des machineries de transcription et de traduction, les réponses physiologiques provoquées par les stéroïdes prennent plusieurs heures à plusieurs jours. Les stéroïdes peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et induire des changements de l'humeur et du comportement (Belelli and Lambert, 2005). Le cerveau est aussi capable de synthétiser des stéroïdes *de novo*, qu'on appelle les neurostéroïdes (Robel and Baulieu, 1994). Les neurostéroïdes sont présents à des concentrations nanomolaires dans le système nerveux central, mais leur concentration peut augmenter de façon significative suite à un stress, par exemple. Contrairement aux effets génomiques classiques des stéroïdes, les neurostéroïdes endogènes agissent localement et produisent des effets importants sur l'excitabilité neuronale, avec des délais allant de quelques secondes à quelques minutes. Ceci suggère que ces molécules peuvent moduler directement des protéines membranaires. Actuellement il est bien connu que les récepteurs $GABA_A$, qui sont à l'origine de la majorité de la transmission inhibitrice dans le système nerveux central, sont les cibles principales des neurostéroïdes (Belelli and Lambert, 2005). Cependant, ces composés régulent aussi l'activité des récepteurs NMDA. Les neurostéroïdes exercent un effet positif ou négatif sur l'activité des récepteurs NMDA, effet qui dépend de la composition en sous-unités des récepteurs et de la structure chimique du neurostéroïde.

Il a été montré que le sulfate de pregnenolone (PS ; Figure 3.1), l'un des neurostéroïdes les plus abondants et un antagoniste des récepteurs $GABA_A$, potentialise les récepteurs NMDA, mais pas les récepteurs AMPA et kainate (Wu et al., 1991; Bowlby, 1993). Le PS est un dérivé de la pregnenolone, une molécule synthétisée dans les cellules gliales par clivage de la chaîne latérale du cholestérol. La potentialisation des récepteurs NMDA par

le PS est indépendante du potentiel transmembranaire, n'affecte pas les conductances unitaires des canaux et se produit pour des concentrations relativement importantes de PS ($> 1\,\mu$M). De façon intéressante, lorqu'il est appliqué dans le milieu extracellulaire, le PS augmente l'activité des récepteurs NMDA enregistrée à partir de "patches" en configuration "cell-attached" ou "outside-out", ce qui indique que le PS, lipophile, peut diffuser à travers la membrane plasmique et atteindre les récepteurs NMDA (Bowlby, 1993). Le PS exerce un effet modulateur sur les récepteurs NMDA recombinants qui dépend du type de sous-unité GluN2 incorporée. En effet, il potentialise l'activité des récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B (avec une EC_{50} de l'ordre de 10-30 μM), alors qu'il inhibe, de façon non-compétitive, les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D (avec une IC_{50} de l'ordre de 100-200 μM ; Malayev et al., 2002; Horak et al., 2006). Le mécanisme d'action du PS a été analysé par des techniques de perfusion rapide sur des cellules HEK-293. Le degré de potentialisation par le PS est un ordre de grandeur plus important quand le PS est appliqué juste avant l'activation des récepteurs NMDA que lorsqu'il est appliqué pendant l'activation. Ceci indique donc que l'affinité des récepteurs NMDA pour le PS est fortement diminuée lorsque ces derniers ont fixé du glutamate (Horak et al., 2004).

Le PS augmente les réponses des récepteurs NMDA en agissant sur un site qui semble être différent du site responsable de la potentialisation par la spermine (Park-Chung et al., 1997). Grâce à la construction de chimères entre les sous-unités GluN2B et GluN2D d'une part (Jang et al., 2004), et GluN2A et GluN2C d'autre part (Horak et al., 2006), le site de potentialisation par le PS a été localisé dans une région de la sous-unité GluN2 comprenant la boucle extracellulaire reliant les segments TM2 et TM3 (qui comprend la partie S2 de l'ABD, voir FIGURE 1.7, page 41) et l'hélice transmembranaire TM3. Dans la boucle TM2-TM3, les hélices J et K de l'ABD semblent avoir un rôle important pour la sensibilité au PS (Jang et al., 2004). Parce que l'hélice J est un constituant clé de l'interface de dimérisation entre les ABDs des sous-unités GluN1 et GluN2, Jang et al. (2004) ont

proposé que le PS se lie à l'interface de dimérisation entre ABDs et la stabilise, selon un mécanisme similaire à celui du cyclothiazide, un modulateur allostérique positif des récepteurs AMPA (voir Section 1.3). Cependant, certaines données expérimentales sont difficiles à concilier avec un mécanisme de type cyclothiazide pour le PS. Tout d'abord, la potentiation par le PS est indépendante de l'inhibition par les protons (Jang et al., 2004), alors que la stablilité du dimère d'ABDs est intimement corrélée à la sensibilité aux protons des récepteurs NMDA (Gielen et al., 2008 et voir Section 3.1). Ensuite, le segment transmembranaire TM3 apparaît comme cruscial pour l'effet potentialisateur du PS, suggérant que cette région puisse contenir des résidus contactant directement le PS (Jang et al., 2004). Ainsi, il se peut que le site potentialisateur du PS soit localisé dans une partie membranaire du récepteur plutôt que dans une région extracellulaire. La nature lipophile du PS et ses lentes cinétiques d'action sur les récepteurs GluN1/GluN2B (Horak et al., 2004) sont compatibles avec cette hypothèse. Il est intéressant de noter que, sur les récepteurs $GABA_A$, ce sont des sites transmembranaires qui sont responsables de l'effet régulateur des neurostéroïdes (Hosie et al., 2006).

L'analogue du PS, le sulfate de 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one (3α5βS ; Figure 3.1), est un autre neurostéroïde endogène qui module l'activité des récepteurs NMDA. Le 3α5βS inhibe les récepteurs NMDA natifs et recombinants avec peu de sélectivité envers les différents sous-types de récepteurs NMDA (Figure 3.8). Il agit de façon non dépendante du potentiel transmembranaire et de façon non compétitive. Par conséquent, son site de liaison ne se situe très probablement pas dans le pore, ni dans les domaines de liaison des agonistes (Park-Chung et al., 1994, 1997; Malayev et al., 2002; Petrovic et al., 2005). Ainsi, malgré des structures chimiques similaires, le PS et le 3α5βS produisent des effets opposés sur les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, le premier agissant comme un modulateur allostérique positif et le dernier comme un modulateur allostérique négatif. Des études de structure-activité sur différents stéroïdes ont permis l'identification des caractéristiques structurales qui déterminent l'action des neu-

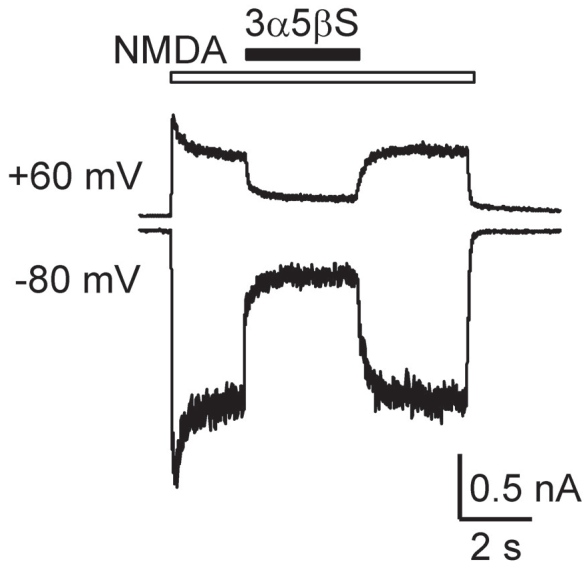


FIGURE 3.8 – Traces de courant induites par une application de 100 μM de NMDA enregistrées sur des cellules HEK293 exprimant des récepteurs GluN1a/GluN2B, à des potentiels de maintien de -80 mV et $+60$ mV. 3α5βS a été appliqué à une concentration de 100 μM aux temps indiqués par la barre noire. D'après Petrovic et al. (2005).

rostéroïdes sur les récepteurs NMDA. La présence d'une charge négative sur le carbone C3 (FIGURE 3.1) semble indispensable pour produire les effets inhbiteurs et potentiateurs des neurostéroïdes (Park-Chung et al., 1997; Weaver et al., 2000). De plus, c'est la géométrie de ces molécules qui influence le signe de la modulation. Les neurostéroïdes ayant une géométrie coudée (comme le 3α5βS ou le 3β5βS) inhibent les réponses des récepteurs NMDA natifs de neurones en culture (principalement des récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et/ou GluN2B), alors que ceux ayant une structure plus plane (comme le PS ou le 3β5αS) potentialisent ces réponses (Weaver et al., 2000). Ainsi, le signe de la modulation allostérique induite par les neurostéroïdes dépend de la géométrie de la jonction entre les cycles A et B de ces molécules, un paramètre qui est déterminé par la stéréochimie du carbone C5 (voir FIGURE 3.1).

Dans ce chapitre, nous avons vu que les récepteurs NMDA présentent de nombreux sites

de modulation allostérique positive ou négative. Certains modulateurs régulent l'activité des récepteurs NMDA *in vivo*, comme les protons, et probablement le zinc, les polyamines, le magnésium et les neurostéroïdes. Les récepteurs NMDA présentant la plus large modulation sont ceux qui contiennent la sous-unité GluN2B. En effet, ils sont (avec les récepteurs contenant la sous-unité GluN2D) les plus sensibles aux protons, et comme leur pH d'IC_{50} correspond au pH physiologique, ce sont les récepteurs dont l'activité est la plus suceptible de varier suite à de faibles modifications du pH extracellulaire. Ils présentent de plus des modulations allostériques spécifiques qui n'existent que sur ce type de récepteurs : une modulation allostérique négative par les dérivés de l'ifenprodil et une modulation allostérique positive (indépendante de la glycine et du potentiel transmembranaire) par les polyamines. Ce sous-type de récepteur présente donc un grand intérêt pharmacologique. Nous allons voir dans le chapitre suivant que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B présentent aussi un grand intérêt comme cible thérapeutique.

Chapitre 4

Les récepteurs NMDA, une cible d'intérêt thérapeutique

Les récepteurs NMDA sont fortement perméables au calcium. Dans les conditions physiologiques, l'entrée de calcium dans la cellule active des voies de signalisation qui sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule. En effet, le bloquage de l'activité des récepteurs NMDA *in vivo* entraîne une mort cellulaire importante (Hardingham and Bading, 2003; Papadia and Hardingham, 2007). Le calcium intracellulaire permet aussi l'induction de formes de plasticités synaptiques (Malenka and Bear, 2004) se traduisant par une LTP ("long term potentiation") ou une LTD ("long term depression"). C'est cette plasticité qu'on considère être la base cellulaire des phénomènes de mémoire et d'apprentissage. En accord avec cette affirmation, des expériences sur des animaux transgéniques ont montré que la surexpression des sous-unités GluN1 ou GluN2B augmente les performances de mémoire et d'apprentissage de ces animaux (Tang et al., 1999; Kalev-Zylinska et al., 2009; Wang et al., 2009), alors que la diminution de l'expression des récepteurs NMDA diminue ces performances (Kalev-Zylinska et al., 2009).

Si trop peu d'activité des récepteurs NMDA est préjudiciable, une trop grande activité de ces récepteurs l'est également. En effet, une trop importante entrée de calcium, suite à une suractivation des neurones, peut entraîner la mort de la cellule. Ce phénomène, appelé excitotoxicité (Olney, 1969; Rothman and Olney, 1987), apparaît notamment dans

les ischémies cérébrales induites à la suite d'accidents vasculaires cérébraux (AVC), ou à la suite de traumatismes crâniens. Les neurones ischémiques, privés d'oxygène et de glucose, ne peuvent plus synthétiser d'ATP et se dépolarisent, conduisant à une libération aberrante de glutamate (Lee et al., 1999). Le phénomène d'excitotoxicité est aussi présent dans certaines maladies du système nerveux central qui impliquent indirectement une dysrégulation du système glutamatergique et une dégénérescence neuronale, telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (Kemp and McKernan, 2002). Il a été montré que les récepteurs NMDA sont les principaux médiateurs de cette excitotoxicité dans les neurones, et que leur inhibition a un effet neuroprotecteur (Lee et al., 1999; Hardingham and Bading, 2003).

En outre, les récepteurs NMDA sont impliqués dans les pathologies associées à une sur-activité des voies excitatrices (sans pour autant qu'il y ait nécessairement excitotoxicité). Cette sur-activité existe dans des pathologies comme les douleurs neuropathiques ou l'épilepsie (Chizh et al., 2001; Kemp and McKernan, 2002). Ainsi, parce que la dysrégulation de l'activité des récepteurs NMDA est impliquée dans de nombreuses pathologiques du système nerveux central, développer des molécules permettant de réguler l'activité de ces récepteurs présente un fort intérêt thérapeutique.

4.1 Récepteurs NMDA et excitotoxicité

Sachant que les récepteurs NMDA ont un rôle dual pour les neurones, leur activité étant à la fois impliquée dans la survie et la mort des cellules (Hardingham and Bading, 2003; Papadia and Hardingham, 2007), de nombreux groupes se sont attachés à déterminer si ces deux phénomènes étaient induits par des populations particulières de récepteurs NMDA. Le sujet est soumis à controverse, mais il est établi que différents paramètres influencent le mode de signalisation des récepteurs NMDA (Kohr, 2006) :

1. La quantité de calcium intracellulaire. Le taux de survie d'une cellule en fonction de

la concentration de calcium intracellulaire suit une courbe en cloche : alors qu'une concentration de calcium intracellulaire physiologique permet l'induction de facteurs de survie, trop ou trop peu de calcium induit une mort cellulaire en inhibant les facteurs de survie et en activant des voies de signalisation pro-apoptotiques (Hardingham and Bading, 2003; Papadia and Hardingham, 2007).

2. La localisation sub-cellulaire des récepteurs NMDA. Il existe une importante littérature montrant que l'activation des récepteurs NMDA postsynaptiques est neuroprotectrice car ces derniers sont couplés à des agents de signalisation anti-apoptotiques tels que la protéine CREB ("cAMP-response-element-binding protein") et le BDNF ("brain-derived neurotrophic factor") (Hardingham et al., 2002) ou la voie de signalisation ERK (extracellular signal-regualted kinase ; Léveillé et al., 2008). Au contraire, l'activation des récepteurs NMDA extrasynaptiques entraîne la mort cellulaire via l'inhibition des agents de survie cellulaire (Hardingham et al., 2002; Léveillé et al., 2008) et l'activation d'agents pro-apoptotiques comme la calpaïne, une protéase activée par le calcium (Xu et al., 2009). Le corrollaire de cette opposition synaptique/extrasynaptique est que ce serait le mode d'activation des récepteurs NMDA qui pourrait influencer le type de signalisation : activation transitoire de courte durée pour les récepteurs NMDA postsynaptiques et activation longue et persistante pour les récepteurs extrasynaptiques (Soriano and Hardingham, 2007).

3. La composition en sous-unités des récepteurs NMDA. Il a été proposé que la dichotomie pro-apoptotique/anti-apoptotique ne serait pas due à la localisation subcellulaire des récepteurs NMDA, mais à leur composition en sous-unités (Zhou and Baudry, 2006; Liu et al., 2007). Les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et/ou GluN2B composent la grande majorité des récepteurs NMDA du cerveau antérieur (voir Section 1.2.1). Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B entraîneraient la mort cellulaire et l'induction de voie de signalisation pro-apoptotiques, alors que les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A auraient un rôle neuropro-

tecteur. Cependant cette séparation n'est pas si simple. En effet, il a été montré, sur des cultures âgées de neurones corticaux, que l'activation des récepteurs contenant la sous-unité GluN2A, prédominants à ce stade de développement, est aussi capable d'induire la mort cellulaire (von Engelhardt et al., 2007). Les résultats de Liu et al. (2007) et von Engelhardt et al. (2007) concernant les récepteurs GluN1/GluN2A doivent être néanmoins pris avec précaution car ils reposent sur l'inhibition de ces récepteurs par un antagoniste compétitif, NVP-AAM077, supposé cent fois plus sélectif pour la sous-unité GluN2A (Auberson et al., 2002), et qui, après ré-examen, s'est révélé être finalement très peu sélectif (Frizelle et al., 2006; Neyton and Paoletti, 2006). De plus, ces études ne prennent pas en compte l'existence de récepteurs trihétéromériques GluN1/GluN2A/GluN2B, pour lesquels il n'existe pas de pharmacologie spécifique (Paoletti and Neyton, 2007).

4. Le stade de développement. Des études sur des neurones hippocampaux à des stades précoces de développement, qui expriment quasi exclusivement des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, montrent que les récepteurs GluN1/GluN2B sont capables d'induire la survie ou la mort des cellules, selon qu'ils sont localisés de façon post-synaptique ou extrasynaptique, respectivement (Martel et al., 2009). Cette étude rejoint les conclusions de Hardingham et al. (2002) et montre que, dans les synapses immatures, la différence de composition entre récepteurs NMDA ne permet pas d'expliquer les différences d'effets induits.

Dans les tissus qui ont été étudiés, l'hippocampe et le cortex, les différentes conclusions se rejoignent car les compartiments extrasynaptiques sont généralement enrichis en récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, alors que les compartiments post-synaptiques contiennent majoritairement des récepteurs contenant GluN2A. De plus, il a été montré que les antagonistes des récepteurs NMDA ciblant spécifiquement la sous-unité GluN2B ont un effet neuroprotecteur dans certains modèles d'excitotoxicité *in vivo* (Liu et al., 2007; Tahirovic et al., 2008), indiquant que, s'ils ne sont pas les médiateurs exclu-

sifs de la mort neuronale, les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B ont un rôle important dans les phénomènes d'excitotoxicité. Cibler spécifiquement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B a donc un intérêt thérapeutique potentiel (voir Section suivante).

4.2 Potentiel thérapeutique des antagonistes des récepteurs NMDA

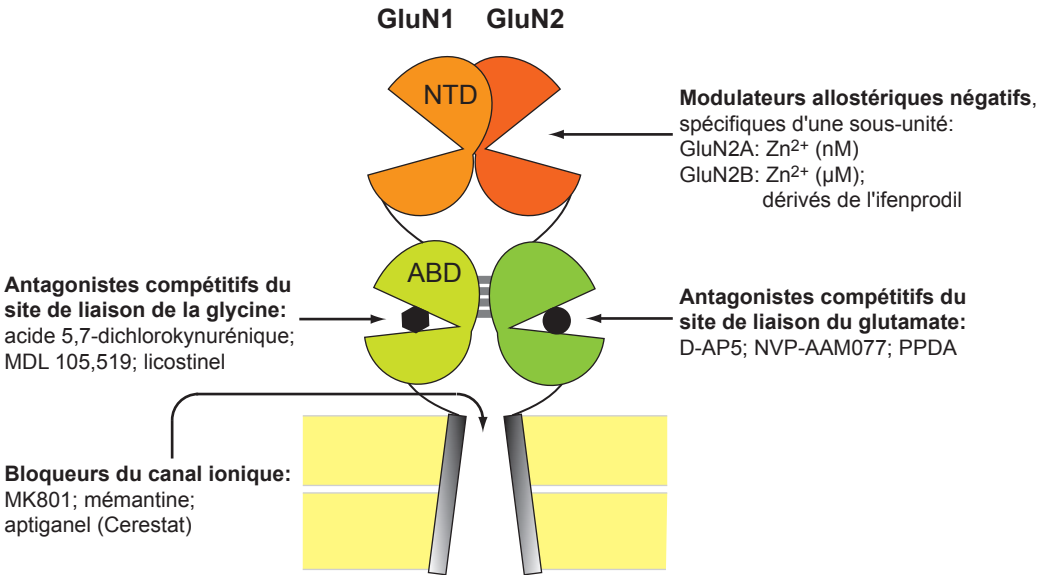


FIGURE 4.1 – Différents sites connus de modulation négative des récepteurs NMDA.

Nous avons vu qu'une activation excessive des récepteurs NMDA pouvait être délétère pour les neurones. Le développement d'antagonistes de ces récepteurs a donc un intérêt thérapeutique potentiel. Actuellement, trois types de modulateurs négatifs ont été caractérisés (Kew and Kemp, 2005; Paoletti and Neyton, 2007 ; et FIGURE 4.1) :

– Les bloqueurs du pore qui se fixent dans le canal ionique et empêchent le passage des ions. Ces bloqueurs partagent généralement un site et un mode de liaison similaires au magnésium : ils exercent une inhibition dépendante du potentiel membranaire,

leur affinité pour le pore des récepteurs NMDA étant plus importante à potentiel négatif qu'à potentiel dépolarisé. Un des bloqueurs les plus utilisés en pharmacologie est le (+)-MK801 (FIGURE 4.2). D'autres exemples de bloqueurs du canal ionique sont donnés en FIGURE 4.2.

– Les antagonistes compétitifs. Ces molécules se fixent dans le site de liaison du glutamate ou de la glycine, empêchant les domaines de liaison des agonistes de se fermer et donc le canal ionique de s'ouvrir (voir Section 1.3). Les antagonistes les plus couramment utilisés en pharmacologie sont le D-AP5 (site de liaison du glutamate, FIGURE 4.3A) et l'acide 5,7-dichlorokynurénique (site de liaison de la glycine, FIGURE 4.3B). D'autres exemples d'antagonistes compétitifs sont donnés en FIGURE 4.3.
– Les modulateurs allostériques négatifs. Ces composés se lient au domaine N-terminal (NTD) de certaines sous-unités GluN2 (voir Section 3.2 pour leur mécanisme d'action). Ainsi, le zinc se lie au NTD de la sous-unité GluN2A avec une affinité nanomolaire ($IC_{50} \simeq 20\,nM$; voir Paoletti et al., 2000, par exemple) et au NTD de la sous-unité GluN2B avec une affinité sub-micromolaire ($IC_{50} \simeq 1\,\mu M$; voir Rachline et al., 2005, par exemple), alors qu'il inhibe très peu les récepteurs NMDA comportant les sous-unités GluN2C et GluN2D (Rachline et al., 2005 et voir Section 3.2). De plus il existe une famille de composés organiques de synthèse, dont le précurseur est l'ifenprodil, qui se lie sélectivement sur le NTD de la sous-unité NR2B (Williams, 1993). Des exemples de modulateurs allostériques négatifs dérivés de l'ifenprodil sont donnés en FIGURE 4.4.

À cause de la forte conservation au sein des récepteurs NMDA des domaines de liaison des agonistes et de la région du pore, les antagonistes compétitifs et les bloqueurs du pore ont très peu de séléctivité vis-à-vis d'un sous-type de récepteurs NMDA. Une légère séléctivité a cependant pu être obtenue pour certains antagonistes compétitifs. C'est le cas de NVP-AAM077, un diastéréoisomère du PEAQX (FIGURE 4.3) se fixant sur l'ABD de

GluN2, qui a une affinité ~ 10 fois plus importante pour la sous-unité GluN2A que la sous-unité GluN2B (Neyton and Paoletti, 2006; Frizelle et al., 2006; Paoletti and Neyton, 2007). Le PPDA (acide (±)-cis-1-(phenanthren-2yl-carbonyl)-piperazine- 2,3-dicarboxylique ; Figure 4.3) a plus d'affinité envers les récepteurs contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D que envers ceux contenant GluN2A et GluN2B, mais sa sélectivité reste faible (< 10 ; Feng et al., 2004). Les modulateurs allostériques négatifs comme les dérivés de l'ifenprodil sont par contre très séléctifs d'un sous-type de récepteurs NMDA. Ces derniers n'inhibent en effet que les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B.

4.2.1 L'échec des antagonistes de première génération : antagonistes compétitifs et des bloqueurs du canal ionique

Au vu de la forte implication des récepteurs NMDA dans les phénomènes d'excitotoxicité, et de l'effet neuroprotecteur du MK801 (Figure 4.2) dans des modèles d'ischémie chez les rongeurs (Park et al., 1988), la première application thérapeutique des récepteurs NMDA a été le traitement des ischémies cérébrales apparaissant lors d'accidents vasculaires cérébraux et de traumatismes crâniens. Dans les années 80, un grand nombre d'antagonistes des récepteurs NMDA, principalement des antagonistes compétitifs et des bloqueurs du canal ionique, ont été développés par les compagnies pharmaceutiques. Cependant, tous ont échoué en phase clinique à cause d'un manque d'efficacité à des doses qui induisaient des effets secondaires inacceptables (Lee et al., 1999; Kemp and McKernan, 2002). L'administration de ces composés entraînait chez les patients des effets psychomimétiques, comme des hallucinations, des problèmes moteurs, ainsi que des problèmes cardiaques, une augmentation de la pression sanguine et des vomissements (Muir, 2006). Parmi les antagonistes qui avaient été développés pour le traitement des accidents vasculaires cérébraux, on peut citer l'aptiganel (Cerestat), un bloqueur du canal ionique (Figure 4.2), et le Selfotel (CGS 19755), un antagoniste compétitif du site de liaison du glutamate (Figure 4.3), tous deux abandonnés en phase III par manque d'efficacité, ou enfin le licostinel (ACEA

1021), un antagoniste du site de liaison de la glycine (FIGURE 4.3), abandonné en phase I (Lee et al., 1999; Muir, 2006).

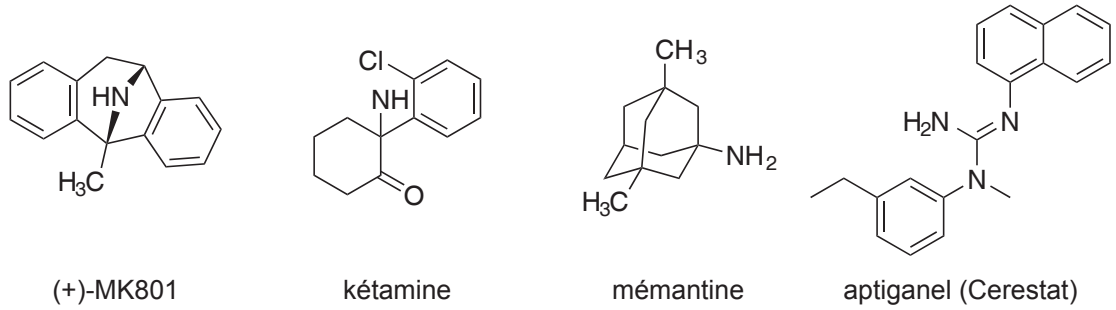
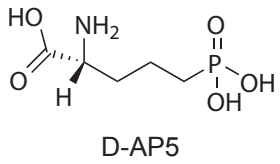


FIGURE 4.2 – Exemples d'antagonistes se fixant dans le canal ionique des récepteurs NMDA.

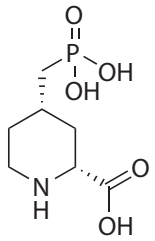
On explique les importants effets secondaires des antagonistes compétitifs et des bloqueurs du canal ionique par leur pauvre sélectivité. Ces derniers inhibent en effet l'entière population des récepteurs NMDA. Or nous avons dit précédemment que l'activité des récepteurs NMDA était indispensable à la survie des neurones. De plus, dans le cas des ischémies cérébrales, l'activité des récepteurs NMDA serait très importante dans la protection de la zone de pénombre située autour de la lésion (Papadia and Hardingham, 2007). En accord avec cette explication, les agonistes partiels à faible efficacité du site glycine, comme le L-687.414 (FIGURE 4.3), produisent moins d'effets secondaires que les antagonistes compétitifs. Leur meilleur profil therapeutique viendrait du fait qu'ils diminuent l'activité des récepteurs NMDA sans les bloquer complètement (Kemp and McKernan, 2002; Kew and Kemp, 2005).

Parmi les antagonistes compétitifs et bloqueurs du pore des récepteurs NMDA, une seule molécule est actuellement sur le marché. Il s'agit de la mémantine (FIGURE 4.2), qui a été approuvée par la "Food and Drug Administration" en octobre 2003 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer (Witt et al., 2004). La mémantine est un bloqueur du pore à faible affinité. Contrairement aux molécules comme le MK801 qui, une fois liées, se dissocient lentement du pore, la mémantine a des cinétiques de dissociation rapides (Johnson and Kotermanski, 2006). Cette importante réversibilité, ajoutée au fait que la

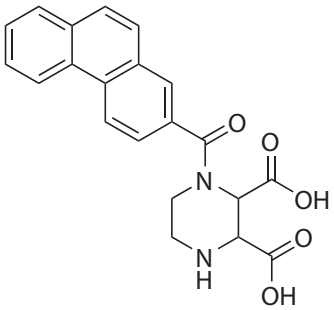
A. Antagonistes compétitifs du site de liaison du glutamate



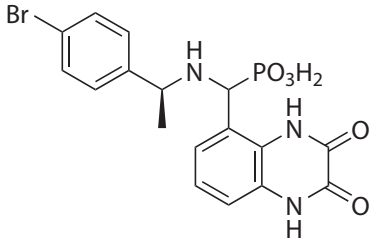
D-AP5



CGS 19755

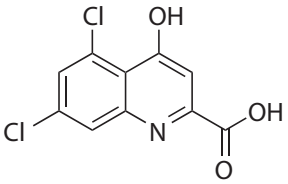


PPDA

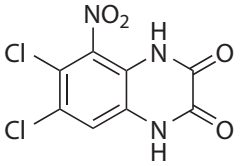


PEAQX

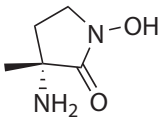
B. Antagonistes compétitifs du site de liaison de la glycine



5,7-DCKA



licostinel (ACEA 1021)



L-687.414

FIGURE 4.3 – Exemples d'antagonistes compétitifs des sites de liaison du glutamate et de la glycine. D-AP5, acide D-2-amino-5-phosphonopentanoïque ; PPDA, acide (2S*,3S*)-1-(phenantrene-2-carbonyl)piperazine-2,3-dicarboxylique ; 5,7-DCKA, acide 5,7-dichlorokynurénique.

mémantine ciblerait spécifiquement les récepteurs extrasynaptiques (Léveillé et al., 2008), expliquerait pourquoi la cette molécule a peu d'effets secondaires par rapport aux autres bloqueurs du canal ionique (Witt et al., 2004). De plus, ils a été montré qu'en présence de concentrations physiologiques de magnésium, la mémantine cible plus particulièrement les récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2C et GluN2D, les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B étant beaucoup moins affectés (Kotermanski and Johnson, 2009). Cette sélectivité envers les sous-unités GluN2C et GluN2D pourrait aussi être un facteur expliquant la meilleure tolérabilité de la mémantine.

4.2.2 Le potentiel des antagonistes de seconde génération : antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B

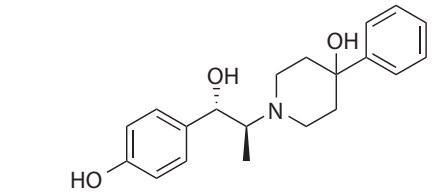
Dans les années 1990 ont été développés les premiers modulateurs allostériques des récepteurs NMDA (les "prodils"), dont la tête de file est l'ifenprodil (FIGURE 4.4). Comme ces composés n'inhibent que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, on s'attend à ce qu'ils soient mieux tolérés. C'est effectivement le cas. Les molécules sélectives de GluN2B ont un effet neuroprotecteur in vivo et ont généralement peu d'effets secondaires (Gill et al., 2002; Kemp and McKernan, 2002; Chazot, 2004; Muir, 2006; Tahirovic et al., 2008). Si l'ifenprodil engendre des problèmes cardiovasculaires suite à sa forte affinité pour les récepteurs adrénergiques $\alpha 1$, les molécules de nouvelle génération comme Ro 25-6981 (molécule **7** FIGURE 4.4 ; Fischer et al., 1997), Cp-101,606 (molécule **5** FIGURE 4.4 ; Chenard et al., 1995) ou Ro 63-1908 (Gill et al., 2002) ont plus d'affinité pour les récepteurs GluN1/GluN2B et présentent moins d'activités extra-NMDA. Il a été montré que l'administration de Cp-101,606 à des rats sains, à une dose qui permet l'occupation complète des récepteurs NMDA hippocampaux contenant la sous-unité GluN2B, ne détériore pas les phénomènes d'apprentissage spatial et de mémoire dans la tâche du "labyrinthe aquatique de Morris" (Morris water maze ; Guscott et al., 2003). Ainsi, contrairement aux antagonistes des récepteurs NMDA à large spectre (antagonistes compétitifs et bloqueurs

du pore), les antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B ont donc des effets neuroprotecteurs, tout en affectant relativement peu la fonction physiologique des récepteurs NMDA.

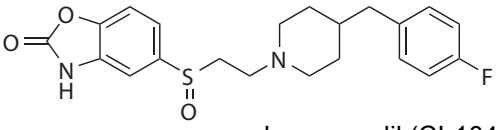
Origines du bon profil thérapeutique des "prodils"

Il existe différentes raisons pour lesquelles les antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B ont peu d'effets secondaires. Tout d'abord, comme nous l'avons déjà dit, ils n'affectent qu'une sous-population de récepteurs, laissant l'activité des récepteurs NMDA contenant les sous-unités GluN2A, GluN2C et GluN2D intacte. De plus, ces composés, à concentration saturante, n'inhibent pas complètement les récepteurs GluN1/GluN2B (inhbition maximale de $\sim 90\,\%$ pour l'ifenprodil ; Kew et al., 1996; Perin-Dureau et al., 2002), permettant une activité résiduelle des récepteurs GluN1/GluN2B. Le fait que les "prodils" ciblent la sous-unité GluN2B est d'autant plus intéressant qu'il a été proposé que les récepteurs NMDA contenant GluN2B ont un rôle important dans l'induction des phénomènes d'excitotoxicité (voir plus haut, Section 4.1). Ces composés épargnent de plus les régions postérieures du cerveau, comme le cervelet, qui expriment très peu la sous-unité GluN2B. Ceci pourrait donc expliquer en partie l'absence de problèmes moteurs suite à leur administration. Enfin, les "prodils" ont un mécanisme d'action "activité-dépendant" permettant de cibler préférentiellement les récepteurs NMDA activés. Tout d'abord, ces molécules exercent une inhibition indépendante du potentiel membranaire et, contrairement aux bloqueurs du canal ionique, conservent donc leur activité lorsque la cellule est dépolarisée (Legendre and Westbrook, 1991; Kew et al., 1996, 1998). De plus, les "prodils" se lient avec une meilleure affinité aux états actif et désensibilisé des récepteurs par rapport à l'état inactif (Kew et al., 1996, 1998). Ils inhibent donc préférentiellement les récepteurs NMDA qui sont activés de façon continue, comme cela se produit dans les conditions pathologiques, en laissant les récepteurs activés de façon transitoire (comme cela se produit dans les conditions physiologiques) non affectés. Le fait que l'affinité de ces

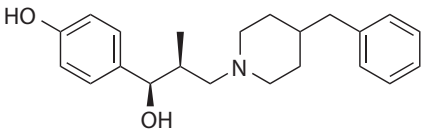
A Structures de type ifenprodil



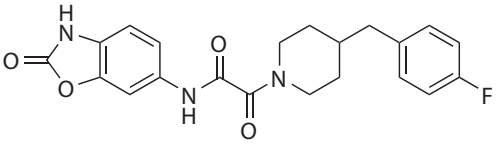
CP-101,606, 'traxoprodil' (Pfizer) [**5**]



besonprodil (CI-1041) [**6**]

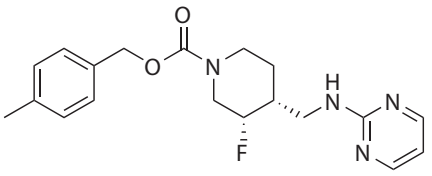


Ro 25-6981 (Roche) [**7**]

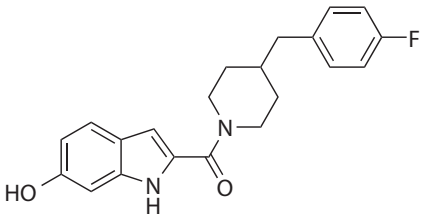


RGH-896,'radiprodil'
(Gedeon Richter/Forest) [**8**]

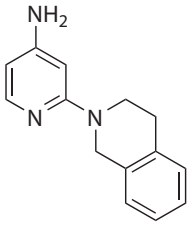
B Antagonistes NR2B de nouvelle génération et nouvelles structures



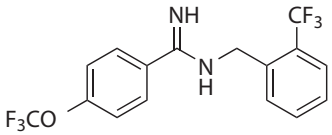
MK-0657 (Merck) [**9**]



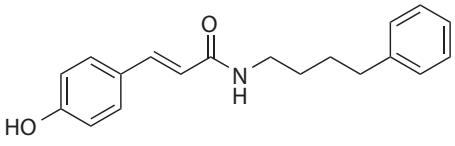
[**10**] Gedeon Richter



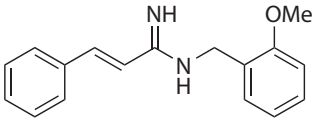
[**11**] Roche



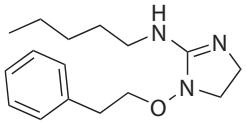
[**12**] Merck



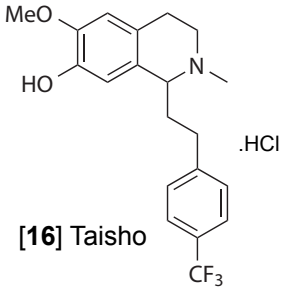
[**13**] CoCensys



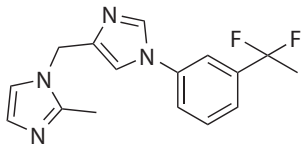
[**14**] Merck



[**15**] Roche



[**16**] Taisho



[**17**] Roche

FIGURE 4.4 – Exemples d'antagonistes spécifiques des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Figure adaptée de la revue de Mony et al. (2009a)

composés augmente lorsque les récepteurs sont actifs présente un avantage indéniable par rapport aux antagonistes compétitifs, dont les concentrations nécessaires sont beaucoup plus importantes afin de déplacer le glutamate ou la glycine de leur site de liaison. De plus, l'efficacité des modulateurs allostériques négatifs de type ifenprodil augmente lorsque le pH diminue (Pahk and Williams, 1997; Mott et al., 1998). Une diminution du pH extracellulaire ayant lieu lors des ischémies cérébrales, l'activité des molécules sélectives de GluN2B est donc augmentée en conditions pathologiques.

Ainsi, grâce à leur sélectivité et leur mécanisme d'action particulier, les modulateurs allostériques permettent de diminuer une activité aberrante des réccepteurs NMDA tout en préservant en partie leur fonction physiologique. Cependant, jusqu'à présent, les composés développés par les compagnies pharmaceutiques ont tous échoué en phase clinique à cause de leur faible biodisponibilité orale, de mauvaises propriétés pharmacocinétiques ou d'une activité trop importante sur les canaux hERG (human ether-à-go-go related gene) (Kew and Kemp, 2005). En particulier, Cp-101,606 un composé prometteur pour le traitement des ischémies cérébrales et des traumatismes crâniens a échoué en phase clinique par manque d'efficacité (Chazot, 2004; Mony et al., 2009a). Le développement de nouvelles séries chimiques d'antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B (Figure 4.4B) devrait permettre de diminuer ces problèmes. Deux composés de nouvelle génération, EVT101 (Evotec, www.evotec.com) et MK-0657 (Merck, molécule **9** Figure 4.4), sont actuellement entrés en phase clinque II pour le traitement de la dépression. Ces composés ont présenté une grande efficacité en phase pré-clinique. La phase clinique II déterminera si ces composés sont aussi efficaces chez l'humain.

Les "prodils" dans le traitement de la douleur

Si les antagonistes des récepteurs NMDA peuvent être potentiellement utilisés pour traiter l'ensemble des pathologies entraînant une sur-régulation du système glutamatergique, les antagonistes spécifiques de GluN2B sont d'autant plus intéressant dans le trai-

tement de la douleur que cette pathologie implique directement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Il est à présent bien établi que les récepteurs NMDA jouent un rôle important dans l'initiation et le maintien des états de douleurs chroniques (douleurs inflammatoires et neuropathiques ; Chizh et al., 2001; Wu and Zhuo, 2009). Les antagonistes à large spectre des récepteurs NMDA ont montré des rôles analgésiques, mais ils ont été abandonnés à causes de leurs trop importants effets secondaires. L'expression des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B est particulièrement importante dans la corne dorsale de la moëlle épinière et dans les régions centrales impliquées dans les voies de la douleur comme le thalamus et le cortex cingulaire antérieur (Watanabe et al., 1993; Monyer et al., 1994; Boyce et al., 1999 et voir FIGURE 1.6 en Section 1.2.1). Des études montrent de plus que les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B sont directement impliqués dans l'établissement de la douleur chronique, en particulier les récepteurs situés dans le cortex. Il a été en effet montré que des souris sur-exprimant la sous-unité GluN2B dans leur cerveau antérieur montrent une sensibilité plus importante à la douleur (Wei et al., 2001). En outre, suite à la lésion d'un nerf, la proportion de récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B augmente dans le cortex cingulaire antérieur (Wu and Zhuo, 2009). Ces résultats indiquent donc que cibler sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B a un rôle thérapeutique potentiel dans le traitement de la douleur. Effectivement, de nombreuses études ont montré que les antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B ont des effets analgésiques dans des modèles animaux de douleur aiguë ou chronique, à des doses qui n'induisent pas de problèmes moteurs ou psychomimétiques (Boyce et al., 1999; Chizh et al., 2001; Qu et al., 2009). Du point de vue clinique, CP-101,606 présentait des effets prometteurs dans le traitement de la douleur chez des patients souffrant de lésion de la moëlle épinière et de monoradiculopathie. Cependant, bien que ce composé soit plutôt bien toléré, il présentait tout de même certains effets secondaires qui ont conduit à l'arrêt des tests. Des espoirs persistent pour les nouvelles séries chimiques d'antagonistes spécifiques de GluN2B (Mony et al., 2009a). Ge-

deon Richter and Forest Laboratories et Merck ont identifié deux produits, le radiprodil (molécule **8** FIGURE 4.4) et MK-0657 (molécule **9** FIGURE 4.4), ayant une bonne disponibilité orale qui sont actuellement en développement clinique pour le traitement de la douleur (phase II).

4.3 Rôles physiopathologiques émergents des récepteurs NMDA

4.3.1 Hypofonction des récepteurs NMDA et schizophrénie

La shizophrénie est une psychose chronique caractérisée par des fonctions mentales et un comportement anormaux (Lewis and Lieberman, 2000; Moghaddam, 2003). Cette maladie se traduit par différentes manifestations cognitives et comportementales comprenant des symptômes "positifs" (hallucinations, troubles de la pensée), "négatifs" (apathie, repli sur soi) et "cognitifs" (troubles de l'attention et troubles de la mémoire) (Tsai and Coyle, 2002). Plusieurs études suggèrent qu'une sous-activation des récepteurs NMDA est liée à l'établissement de la schizophrénie. Il a été montré que les bloqueurs du pore à large spectre des récepteurs NMDA, tels que la kétamine et la phénylcyclidine (PCP), sont capables de provoquer et même de récapituler les symptômes positifs, négatifs et cognitifs caractéristiques de la schizophrénie chez les humains (Tsai and Coyle, 2002). De plus, des souris transgéniques qui présentent une expression fortement réduite de la sous-unité GluN1 possèdent aussi ces symptômes (Mohn et al., 1999; Ballard et al., 2002).

Ces résultats indiquent donc qu'augmenter l'activité des récepteurs NMDA pourrait être une bonne solution pour lutter contre la schizophrénie. L'activation directe des récepteurs NMDA par des agonistes du site glutamate est difficilement concevable à cause de l'excitotoxicité que ces composés pourraient générer. Actuellement, les stratégies pour augmenter l'activité des récepteurs NMDA se sont focalisées sur l'augmentation du taux d'occupation du site de liaison de la glycine (Moghaddam, 2003) en administrant (i) des agonistes du site glycine (D-sérine, D-cyclosérine ou N-méthyl-glycine) ; (ii) des inhibiteurs

spécifiques des transporteurs de la glycine GLYT1, permettant d'augmenter la concentration de glycine extracellulaire ; et (iii) des modulateurs allostériques positifs et agonistes des mGluRs $mGlu_5$ et $mGlu_{2/3}$ qui régulent l'activité des récepteurs NMDA. Une autre stratégie intéressante serait d'augmenter l'activité des récepteurs NMDA à l'aide de modulateurs allostériques positifs. Peu de modulateurs allostériques positifs sont connus à ce jour pour les récepteurs NMDA. On trouve certains neurostéroïdes, comme le sulfate de pregnenolone, qui potentient les récepteurs contenant les sous-unités GluN2A et GluN2B, et les polyamines, qui potentient sélectivement les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Mony et al., 2009a et voir Chapitre 3). Le développement de modulateurs partageant le site de liaison des polyamines pourrait présenter un intérêt dans le traitement de la schizophrénie car ils conduiraient à une potentiation sélective des récepteurs NMDA contenant GluN2B, laissant les autres sous-types de récepteurs NMDA inaffectés. Cependant, nous avons montré ci-dessus que la sur-activation des récepteurs GluN1/GluN2B jouait un rôle important dans l'excitotoxicité et la douleur. Il peut être donc dangereux de cibler spécifiquement cette sous-unité.

4.3.2 Sous-unité NR3A, oligodendrocytes et gaine de myéline

Il a longtemps été supposé que l'expression des récepteurs NMDA dans le système nerveux central était restreinte aux neurones. Cependant, des études plus récentes ont montré que les récepteurs NMDA sont aussi exprimés dans les oligodendrocytes (Salter and Fern, 2005; Karadottir et al., 2005; Micu et al., 2006). Les oligodendrocytes sont des cellules gliales de la matière blanche qui produisent la gaine de myéline entourant les axones des neurones. Un excès de glutamate peut entraîner un endommagement de ces cellules et provoquer une démyélinisation des axones, phénomène observé dans certaines pathologies comme les infirmités motrices cérébrales, les lésions de la moëlle épinière, la sclérose en plaques et les ischémies cérébrales. On a tout d'abord supposé que l'excitotoxicité était induite par des récepteurs AMPA et kainate perméables au calcium. Si c'est effectivement

le cas au niveau du soma des oligodendrocytes (Salter and Fern, 2005), trois groupes ont montré que des récepteurs NMDA sont exprimés dans les prolongements de ces cellules (Karadottir et al., 2005; Salter and Fern, 2005; Micu et al., 2006). La sur-activation de ces récepteurs NMDA provoque une forte entrée de calcium dans les prolongements des oligodendrocytes (Micu et al., 2006) et une dissociation de ces structures par rapport au soma (Salter and Fern, 2005). Les récepteurs NMDA présents sur les oligodendrocytes sont faiblement bloqués par le magnésium, ce qui suggère une composition "non-conventionnelle" (c'est-à-dire, sans sous-unité GluN2A ou GluN2B) de ces récepteurs (Karadottir et al., 2005). Effectivement, les trois études ont montré que les oligodendrocytes expriment de façon importante les sous-unités GluN2C et GluN3A (mais pas GluN3B), deux sous-unités connues pour générer un faible blocage par le magnésium.

Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN3A (et GluN2C) sont donc potentiellement des cibles thérapeutiques intéressantes pour contrecarrer la dégénérescence de la matière blanche. Actuellement, aucune pharmacologie sélective n'est connue pour la sous-unité GluN3A. Cependant, bien que GluN3A et GluN1 lient toutes-deux la glycine, leur pharmacologie est distincte (Chatterton et al., 2002; Yao and Mayer, 2006; Yao et al., 2008), indiquant qu'il devrait être possible de développer des antagonistes ciblant sélectivement la sous-unité GluN3A. Il faut noter néanmoins que GluN3A a une très forte affinité pour la glycine, de l'ordre de 650 fois plus importante que GluN1 ($K_d = 40\,nM$ pour la sous-unité GluN3 contre $25\,\mu M$ pour la sous-unité GluN1 ; Yao and Mayer, 2006). Par conséquent, seuls des antagonistes très affins, capables de déplacer la glycine endogène, pourraient avoir un effet thérapeutique.

Sous-unité GluN1	N1a	N1b	N1a	N1b	N1a	N1a
Sous-unité GluN2	N2A	N2A	N2B	N2B	N2C	N2D
EC_{50}(glutamate) (μM)	4		2		1	0,4
EC_{50}(glycine) (μM)	1,7		0,4		0,3	0,1
τ_{off}(glutamate) (ms)	40		300		300	2000
Po(max)	0,4-0,5		0,1-0,2		$\sim 0,01$	$\sim 0,01$
$IC_{50}(Mg^{2+})$ (μM) ($V_m = -100\,mV$)	2		2		12	12
pH d'IC_{50}	7,0	6,7	7,4	6,7	6,5	7,4
IC_{50}(zinc) (μM)	0,02		1,0		18	9,2
IC_{50}(ifenprodil) (μM)	> 30		0,2		> 30	> 30
Potentiation par la spermine dépendante de la glycine	oui	oui	oui	oui	non	non
Potentiation par la spermine indépendante de la glycine EC_{50}	non	non	oui $\sim 150\,\mu M$	non à pH = 7,3, oui à pH acide	non	non

TABLE 4.1 – Tableau récapitulatif des propriétés pharmacologiques des différents sous-types de récepteurs NMDA.

Conclusion

Nous avons vu que les récepteurs ionotropiques du glutamate, bien qu'activés par le même ligand, possèdent des propriétés biophysiques et pharmacologiques très diverses. Parmi les iGluRs, les récepteurs NMDA forment une classe à part, qui se traduit en premier lieu par une relativement faible identité de séquence de ces récepteurs avec les récepteurs AMPA et kainate. Contrairement aux récepteurs AMPA, les récepteurs NMDA sont bloqués par le magnésium dans les cellules au repos et leur activation requiert la liaison de deux agonistes, la glycine et le glutamate. De plus, les divers sous-types de récepteurs NMDA, formés par la combinaison de différentes sous-unités GluN2 et différents variants d'épissage de la sous-unité GluN1, ont des répartitions cellulaires et subcellulaires distinctes et des propriétés biophysiques variées. Enfin, ces récepteurs possèdent une pharmacologie riche. Tous ces éléments permettent une régulation fine de l'activité des récepteurs NMDA. Les récepteurs NMDA, grâce à leur forte perméabilité au calcium, jouent en effet un rôle très important dans l'induction de différentes formes de plasticités synaptiques, mais leur suractivation est impliquée dans les phénomènes d'excitotoxicité qui induisent la mort neuronale. Il est donc important que leur activité soit finement régulée.

Parmi les différents sous-types, les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B présentent un intérêt particulier. En effet, ce sont des cibles thérapeutiques intéressantes : leur sur-activation semble jouer un rôle important dans la mort neuronale et ils sont impliqués directement dans certaines pathologies comme les douleurs chroniques. De plus, c'est actuellement le seul sous-type de récepteur NMDA pour lequel on connaît des anta-

gonistes sélectifs qui ont été développés en phase clinique pour traiter un certain nombre de pathologies du système nerveux central. Les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B représentent en effet les récepteurs ayant la pharmacologie la plus riche, car ce sont les seuls à posséder des modulateurs allostériques les ciblant exclusivement : l'ifenprodil et ses dérivés comme antagonistes et les polyamines et le magnésium comme potentialisateurs lorsque la concentration de glycine est saturante. Cependant, malgré toute la pharmacologie connue sur les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B, les sites de liaison et les mécanismes d'action des différents modulateurs allostériques sont encore mal connus. Or, une meilleure compréhension des mécanismes de modulation des récepteurs GluN1/GluN2B pourrait permettre le développement de nouvelles stratégies pour contrer les effets délétères des dysrégulations de l'activité des récepteurs NMDA. Pendant ma thèse, je me suis donc attachée à étudier certains modulateurs allostériques des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Tout d'abord, j'ai proposé une structure tridimensionnelle du site de liaison de l'ifenprodil. Le site de liaison de l'ifenprodil avait déjà été localisé dans le NTD de la sous-unité GluN2B, mais les déterminants moléculaires précis de l'interaction entre l'ifenprodil et le NTD n'étaient pas connus. Enfin, dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai déterminé le site de liaison et la mécanisme d'action des polyamines, composés qui potentialisent spécifiquement les récepteurs GluN1/GluN2B en présence d'une concentration saturante de glycine.

Deuxième partie

Résultats

Chapitre 5

Étude des déterminants moléculaires à l'origine de la liaison de l'ifenprodil dans le domaine N-terminal de GluN2B

5.1 Contexte de l'étude

L'ifenprodil est un composé organique de synthèse inhibant de façon sélective les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B (Williams, 1993). Cette molécule est le précurseur d'une importante famille d'antagonistes sélectifs des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Ces molécules ont démontré des effets neuroprotecteurs *in vivo*, sans pour autant produire les effets secondaires provoqués par les antagonistes à large spectre des récepteurs NMDA (antagonistes compétitifs et bloqueurs du canal ionique ; Chizh et al., 2001; Kemp and McKernan, 2002; Kew and Kemp, 2005), ce qui en fait des composés à fort potentiel thérapeutique.

Des expériences sur des NTDs isolés en solution et sur des récepteurs contenant des sous-unités chimériques GluN2A/GluN2B ont permis de localiser le site de liaison de l'ifenprodil dans le domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B (Gallagher et al., 1996; Perin-Dureau et al., 2002; Wong et al., 2005; Ng et al., 2008; Han et al., 2008). De plus, des expériences de mutagénèse dirigée ont montré que les résidus contrôlant la sensibilité

à l'ifenprodil et à ses dérivés sont situés dans des boucles tapissant la crevasse interlobaire de ce domaine (Perin-Dureau et al., 2002; Malherbe et al., 2003; Ng et al., 2008; Wee et al., 2010). Les résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil sont situés sur les deux lobes du NTD de la sous-unité GluN2B, suggérant un mécanisme dans lequel l'ifenprodil, en se liant, induit la fermeture du NTD. Cependant, malgré la quantité de données de mutagenèse dirigée et l'énorme variété chimique d'antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B, le mode de liaison de l'ifenprodil n'avait pas encore été déterminé. De plus, l'origine de la sélectivité de ces composés pour la sous-unité GluN2B n'était pas connue.

Cette méconnaissance provenait d'un manque de données structurales. En effet, à l'époque où nous avons commencé ce travail, alors que de nombreuses données cristallographiques existaient sur les domaines de liaison des agonistes des iGluRs (Armstrong and Gouaux, 2000; Mayer, 2005; Furukawa et al., 2005), aucune structure de NTD d'iGluRs n'avait été publiée. Le domaine N-terminal des récepteurs NMDA partage une faible similarité de séquence avec les protéines de la famille LIVBP (O'Hara et al., 1993; Masuko et al., 1999; Paoletti et al., 2000). Comme ces protéines, il est composé de deux lobes reliés par une charnière et définissant une fente interlobaire. Ainsi, les seules données structurales qui existaient étaient des modèles par homologie des NTDs des sous-unités GluN2A (Paoletti et al., 2000) ou GluN2B (Perin-Dureau et al., 2002; Malherbe et al., 2003; Marinelli et al., 2007) réalisés à partir des structures cristallographiques de la protéine LIVBP ou du domaine de liaison du glutamate du récepteur métabotropique $mGlu_1$, un domaine appartenant à la famille LIVBP. Les NTDs des récepteurs NMDA ne partageant qu'un faible pourcentage d'identité avec LIVBP et le domaine de liaison du glutamate (ABD) de $mGlu_1$ ($\sim 12\,\%$ d'identité), les modèles produits étaient de faible précision (Baker and Sali, 2001). De plus, jusqu'à présent, aucun modèle de NTD de GluN2B contenant l'ifenprodil et validé par des expériences fonctionnelles n'avait été proposé.

Nous avons donc cherché à construire un modèle de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de la sous-unité GluN2B, cohérent avec les données de mutagénèse dirigée déjà publiées

et validé par des expériences fonctionnelles. Pour réaliser ce modèle, nous avons choisi d'utiliser les coordonnées tridimensionnelles de l'ABD de $mGlu_1$. Bien que ne partageant que 12 % d'identité de séquence avec le NTD de GluN2B, l'ABD de $mGlu_1$ représentait, parmi les protéines de la famille LIVBP, le domaine cristallisé le plus proche en séquence du NTD de GluN2B. De plus, ce domaine a été cristallisé sous forme fermée, ce qui en fait un bon "gabarit" pour modéliser le NTD de GluN2B en présence d'ifenprodil.

La qualité d'un modèle par homologie est en grande partie déterminée par la qualité de l'alignement de séquences entre la protéine cible (ici le NTD de GluN2B) et la protéine de référence (ici l'ABD de $mGlu_1$) (Baker and Sali, 2001). À cause de la faible identité de séquence entre le NTD de GluN2B et l'ABD de $mGlu_1$, nous avons adopté certains biais pour aligner les deux séquences. L'alignement est particulièrement difficile au niveau des boucles, car ces dernières divergent fortement entre les deux domaines. Or, c'est justement la structure des boucles qui tapissent la crevasse interlobaire qui va déterminer le mode de liaison de l'ifenprodil à l'intérieur du NTD de GluN2B. Nous avons donc pris le parti d'aligner les résidus connus pour contrôler la sensibilité à l'ifenprodil ou au zinc des récepteurs GluN1/GluN2B (Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005) avec des résidus de l'ABD de $mGlu_1$ pointant vers la crevasse interlobaire de ce domaine. Ce parti pris constitue une contrainte importante sur la structure prédite du NTD de GluN2B et la liaison de l'ifenprodil qui en découle. Nous avons donc pris un soin tout particulier à valider de façon fonctionnelle le rôle des résidus pointant vers la crevasse interlobaire et prédits comme interagissant avec l'ifenprodil dans le modèle par homologie obtenu.

La technique de marquage d'affinité sur cystéines comme validation du modèle de liaison de l'ifenprodil

De nombreuses données de mutagénèse dirigée existent concernant les résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil (Perin-Dureau et al., 2002). Cependant, lorsque la mutation d'un résidu diminue la sensibilité à l'ifenprodil, il est difficile de savoir si le résidu muté

interagit directement avec l'ifenprodil (résidu de "liaison"), où s'il est important pour la structure de la protéine, sa mutation entraînant indirectement la perturbation du site de liaison de l'ifenprodil (résidu "structural"). Or, comme nous fondons notre alignement de séquence sur les données de mutagénèse dirigée publiées, en faisant pointer les résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil vers la crevasse interlobaire, il est important de distinguer les résidus de "liaison" des résidus "structuraux". De plus, afin de valider le modèle de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B, il est nécessaire d'avoir un moyen expérimental permettant de démontrer que les résidus interagissant avec l'ifenprodil dans le modèle sont expérimentalement des résidus de "liaison".

Le NTD de la sous-unité GluN2B présente la particularité de pouvoir lier deux ligands de nature chimique très différente : le zinc et l'ifenprodil (Rachline et al., 2005). Ainsi, en comparant les résidus contrôlant les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B, on peut avoir une idée des résidus interagissant directement avec l'ifenprodil ou le zinc et des résidus plutôt "structuraux" (Figure 5.1). On considère que les résidus dont la mutation affecte seulement la sensibilité à l'ifenprodil sont des résidus appartenant au site de liaison de l'ifenprodil ; de même, les résidus contrôlant uniquement la sensibilité au zinc sont considérés comme des résidus appartenant au site de liaison du zinc. Au contraire, les résidus contrôlant à la fois les sensibilités à l'ifenprodil et au zinc des récepteurs GluN1/GluN2B sont plutôt considérés comme résidus "structuraux".

Cependant, comme le zinc et l'ifenprodil interagissent de façon compétitive sur le NTD de GluN2B (Rachline et al., 2005), des résidus contrôlant à la fois les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil pourraient aussi faire partie des sites de liaison des deux composés. De plus, des résidus contrôlant uniquement la sensibilité à l'ifenprodil pourraient ne pas directement interagir avec l'ifenprodil, mais faire partie de sa "seconde sphère de coordination". Enfin, les données de mutagénèse dirigée ne donnent pas d'information sur la région précise du ligand qui interagit avec un résidu précis de la protéine. Pour toutes ces raisons, nous avons voulu mettre en évidence des interactions directes entre une région précise du NTD

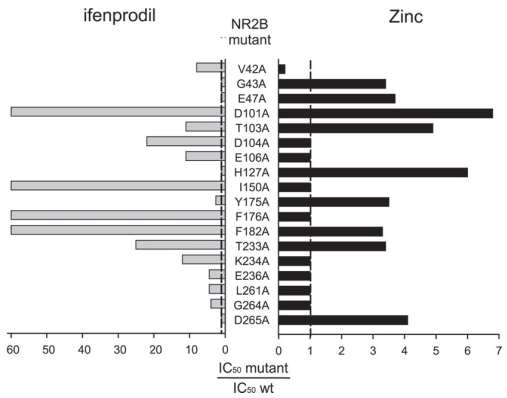


FIGURE 5.1 – Comparaison des résidus contrôlant les sensibilités à l'ifenprodil et au zinc des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. D'après Rachline et al. (2005).

de GluN2B et une partie précise de l'ifenprodil, afin de valider le modèle de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B.

Nous avons donc décidé d'utiliser la technique de marquage d'affinité sur cystéines, qui consiste à établir une liaison covalente entre un récepteur dans lequel une cystéine a été introduite à une position précise et un ligand fonctionnalisé par un groupement réactif sur cystéines (Foucaud et al., 2001 et FIGURE 5.2A). Lorsque la cystéine introduite et le groupement thio-réactif sont proches dans l'espace, une liaison covalente se forme et donne lieu à un marquage irréversible du récepteur. Par contre, si la cystéine introduite est loin du groupement thio-réactif, aucune liaison covalente ne se forme (FIGURE 5.2B). Cette technique permet donc d'identifier les résidus interagissant avec une partie précise de la protéine. De plus, elle permet d'orienter le ligand dans sa poche de liaison.

Nous avons pour cela établi une collaboration avec le Laboratoire de Chimie Bioorganique, à l'Université Louis Pasteur de Strasbourg. En effet, dans ce laboratoire, cette technique avait déjà été utilisée avec succès pour déterminer le mode de liaison d'un antagoniste compétitif du site glycine des récepteurs NMDA, L-701,324 (Kreimeyer et al., 1999; Foucaud et al., 2003). Des dérivés de L-701,324, substitués par des groupements thio-réactifs à différents endroits de la molécule, avaient été appliqués sur des récepteurs dont une position précise avait été modifiée en cystéine. Le marquage irréversible était

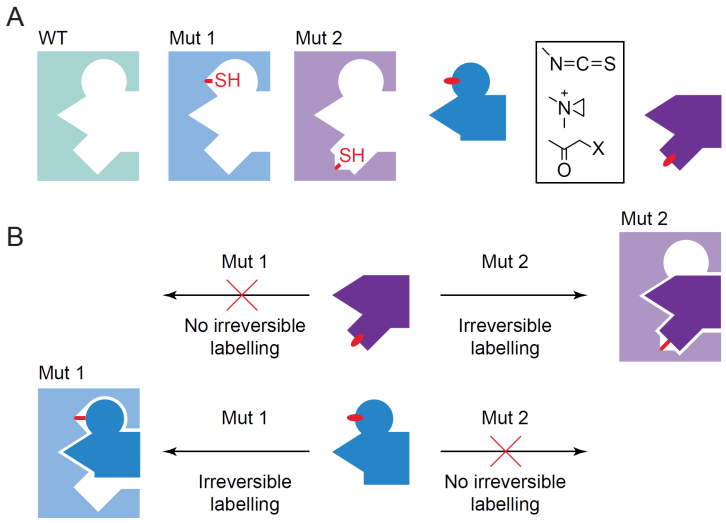


FIGURE 5.2 – Principe du marquage d'affinité sur cystéines. D'après Foucaud et al. (2001). A, Cette technique est basée sur la formation d'une liaison covalente entre un récepteur où une cystéine a été introduite et un ligand thio-réactif. Sur les ligands, le groupement réactif sur cystéines est représenté par un ovale rouge. Différentes fonctions thio-réactives sont représentées dans l'encadré. B, La cystéine du récepteur et le groupement thio-réactif du ligand ne réagissent ensemble que s'ils sont proches l'un de l'autre. Cette approche donne donc des informations sur l'orientation du ligand dans sa poche de liaison.

mis en évidence par une inhibition irréversible des courants des récepteurs NMDA. Les résultats obtenus se sont révélés remarquablement cohérents avec la structure cristallographique publiée plus tard du site de liaison de la glycine dans l'ABD de GluN1 (Furukawa and Gouaux, 2003).

Dans le cas de notre travail, des dérivés d'ifenprodil thio-réactifs, fonctionnalisés à différents endroits de la molécule ont été synthétisés dans le Laboratoire de Chimie Bioorganique. La synthèse et l'évaluation fonctionnelle de ces composés sont présentées dans l'article I. Nous avons ensuite utilisé ces composés pour valider notre modèle de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B, présenté dans l'article II.

5.2 Article I

Reactive derivatives for affinity labeling in the ifenprodil site of NMDA receptors

Karine Alarcon, Adeline Martz, Laetitia Mony, Jacques Neyton, Pierre Paoletti, Maurice Goeldner and Bernard Foucaud

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 2765–2770

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 2765–2770
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

Reactive derivatives for affinity labeling in the ifenprodil site of NMDA receptors

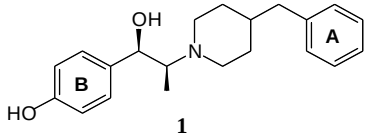
Karine Alarcon,[a,*] Adeline Martz,[a] Laetitia Mony,[b] Jacques Neyton,[b] Pierre Paoletti,[b] Maurice Goeldner[a] and Bernard Foucaud[a]

[a]*Laboratoire de Chimie Bioorganique, CNRS UMR 7175, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, 74 Route du Rhin, F-67401 Illkirch, France*
[b]*Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France*

Received 19 March 2008; revised 7 April 2008; accepted 8 April 2008
Available online 11 April 2008

Abstract—To prepare thiol-reactive ifenprodil derivatives designed as potential probes for cysteine-substituted NR2B containing NMDA receptors, electrophilic centers were introduced in different areas of the ifenprodil structure. Intermediates and final compounds were evaluated by binding studies and by electrophysiology to determine the structural requirements for their selectivity. The reactive compounds were further tested for their stability and for their reactivity in model reactions; some were found suitable as structural probes to investigate the binding site and the docking mode of ifenprodil in the NR2B subunit.
© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

NMDA receptors (NMDARs) are a subtype of ionotropic glutamate receptors widely distributed in the vertebrate central nervous system. NMDARs play major roles in both physiological and pathological states of the CNS, including ischemic stroke, seizures, head trauma and pain. NMDARs occur as hetero-oligomers composed of NR1, NR2 (of which there are four: NR2A–NR2D), and more rarely NR3 subunits.[1,2] Because non-selective NMDAR antagonists have impeding adverse side effects, attention has focused toward drugs capable of modulating selectively certain subtypes of NMDARs. The NR2B-selective type of non-competitive antagonists has a strong potential in this regard, showing both neuroprotective and analgesic properties together with little side effects.[3–5] It has been recently shown that the N-terminal domain (NTD) of the NR2B subunit forms the binding site of ifenprodil (**1**)[6] and Ro256981,[7] two prototypic NR2B-selective antagonists, while an extensive pharmaco-chemical research had led to the description of common structural features for this family of compounds.[8–10] Our knowledge of their binding site is based on homology 3D modeling and mutational analysis: the NR2B NTD has been modeled after a periplasmic protein from *Escherichia coli* (LIVBP),[6,11,12] as well as after the glutamate binding domain of the mGluR1 receptor[7]: it is proposed to fold as two lobes separated by a large central cleft.[6] Mutating residues located in the central cleft of the NR2B NTD abolishes the high sensitivity to ifenprodil and derivatives.[6,12–14] Other biochemical evidences[6,15–17] also support the location of the ifenprodil binding site in the NTD of the NR2B subunit and in its cleft; however, the effects of the mutation of residues not located in this domain suggest alternative hypotheses.[11]



1

In order to propose a docking mode of ifenprodil in the NTD of NR2B, we pursued a strategy combining cysteine-scanning mutagenesis and affinity labeling.[18] In this strategy, the formation of a covalent bond between a cysteine-reactive ligand derivative and a cysteine-substituted receptor enables to identify direct interactions between the ligand and a precise region of the receptor. In the recent years, we have applied this strategy to explore the glycine binding site (NR1 subunit) of the NMDA receptor.[19,20] Our results were obtained using full-length, membrane-inserted NR1/NR2 receptors; they provided our structural homology model

Keywords: Ifenprodil; NR2B; NMDA.
* Corresponding author. Tel.: +0390244161; fax: +0390244306. e-mail: alarcon@bioorga.u-strasbg.fr

0960-894X/$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bmcl.2008.04.019

with an experimental basis and established a general docking mode for antagonists at the gly_B site. These were remarkably consistent with the crystal structure of the agonist binding domain of the NR1 subunit (S1–S2 soluble fragment).[21]

This letter describes the stepwise approach toward thiol-reactive ifenprodil derivatives suitable for structural investigations of the binding site for NR2B selective inhibitors of the NMDARs. The affinity and reactivity of the derivatives should indeed be high enough for the occurrence of a covalent bond formation with a cysteine-mutated receptor while they occupy the binding site.[22]

A reliable docking of ifenprodil-like compounds being our final purpose, we have synthesized molecules consistent with their main structural features: two aryl rings, one located in a hydrophobic environment (ring A) and a ring substituted by polar groups (ring B), while a tertiary amine, at the center of the molecule, is connected to each ring by a linker.[23] A distance of 9–11 Å between the two rings, in an extended conformation of the molecule, was also suggested.[9] Electrophilic substituents were introduced in carbon positions which were selected to explore the different areas of the binding site corresponding to these components of the ligand's structure. Intermediate and final compounds were tested as ligands for the NR2B NTD site, and, for some of them, as effectors of the recombinant NR1/NR2B NMDARs. The reactive compounds were also tested for their stability and their reactivity toward thiols in model conditions. Their potential as structural probes for the ifenprodil binding site of NMDARs is discussed.

The synthetic pathways for these compounds can be found in Scheme 1. In compounds **4** and **5**, the hydroxyle group of ring B in ifenprodil has been replaced by a chloroacetamido group or an isothiocyanate group, respectively; moreover, one asymmetric center has been suppressed by converting, on the linker, the secondary alcohol into a ketone. Its synthesis involves first a Friedel-Crafts[24] reaction between acetanilide and 2-bromopropionyl chloride. Subsequently, the substitution of the bromide by 4-benzylpiperidine yielded precursor **2**. The thiol-reactive probes **4** and **5** were finally obtained by the deprotection of the aromatic amine affording compound **3**, followed by functionalization.

Compounds (±) **6** and (±) **7** conserved the structure of ifenprodil; they differed only by the presence of the amino function instead of the phenolic group. Their synthesis involved the reduction of ketone **2**, affording 4 diastereoisomers which were separated by column chromatography as erythro- and threo-racemic mixtures. The final deprotections yielded racemic threo-(±) **6** and erythro-(±) **7** derivatives.

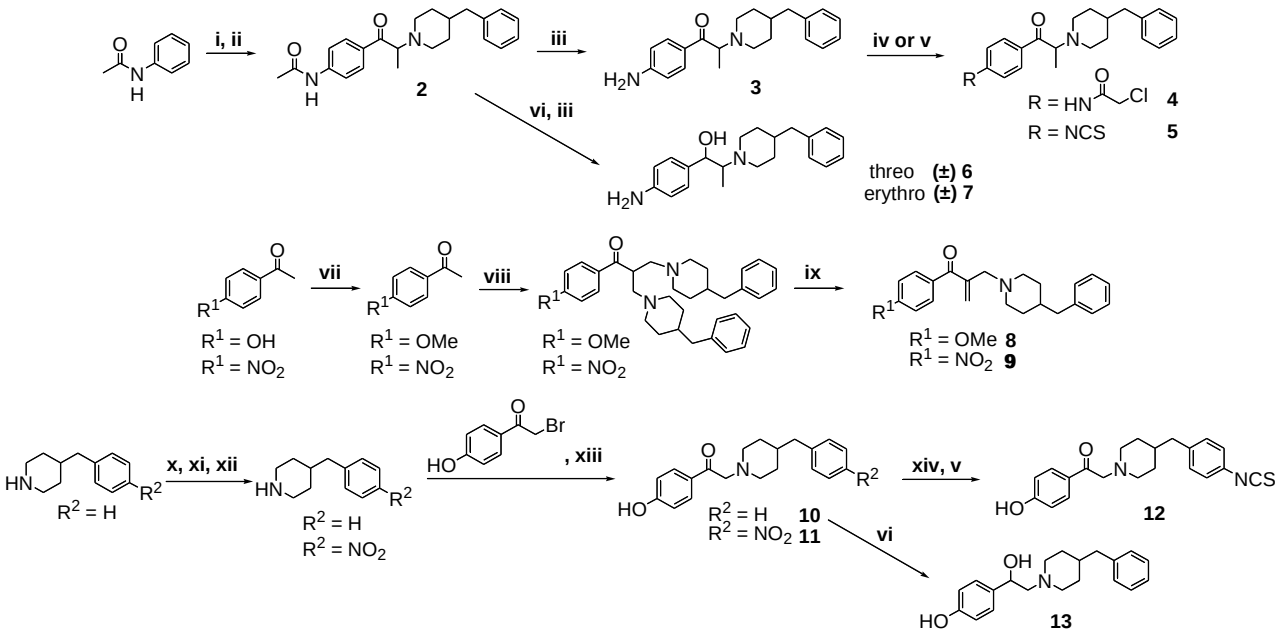
Compounds **8** and **9**, whose linker, compared to the reference ifenprodil molecule, contains a Michael acceptor together with an additional carbon atom required a different synthetic pathway. After conversion of the B ring phenol group into a methoxy derivative (to avoid reaction in the ortho position[25]), a Mannich reaction with paraformaldehyde and 4-benzylpiperidine under acidic catalysis yielded condensation products where two aminomethyl groups have been introduced.[26] Finally, the elimination of one benzylpiperidine group on silica gel produced the propenone derivatives **8** and **9**.

In compound **12**, ifenprodil's asymmetric centers have been suppressed and a reactive-NCS function was introduced on aromatic ring A. A high yield synthesis of the nitro precursor **11** was achieved by coupling *p*-hydroxybromophenacyle[27] to 4-(4-nitrobenzyl)-piperidine, which was prepared in a three-step procedure from 4-benzylpiperidine.[28] Compound **10** was obtained from commercially available 4-benzylpiperidine using the same synthetic pathway. Ligand **12** was synthesized by the hydrogenation of the nitro compound **11** followed by treatment with thiophosgene in a tetrahydrofurane/aqueous Na_2CO_3 solution mixture. Compound **13**, designed to estimate the influence of asymmetry in ifenprodil, was obtained by the reduction of precursor **10** with sodium borohydride. Compounds **2**–**13** were fully characterized by ^1H NMR and HRMS. The purity of the reactive compounds was checked by HPLC.[29]

The affinities of compounds **2**–**13** were measured by equilibrium binding to rat brain membranes in competitions against ^3H-ifenprodil as in Ref. 30: ^3H-ifenprodil (2.501 Gbq./mmol from Perkin-Elmer Life Sciences) was incubated with the membranes for 2 h at 4 °C in 5 mM Tris–chloride buffer, pH 7.4, in the absence or presence of 10 μM Ro-084304 for the determination of the non-specific binding. K_Is were calculated from the measured IC_{50}s[31] and from a K_D of 11 ± 1.5 nM (n = 5) for ifenprodil, that we measured following a previously published protocol[30] (Table 1).

The replacement of the *p*-hydroxyl group in ring B of ifenprodil by an amino group (compound (±) **7**) decreases its affinity by ca. one order of magnitude, while the conversion of this amine group of precursor **3** into amide **2**, chloroacetamide **4** and isothiocyanate **5** further shifts the K_I value by a factor of 1.8, 8.5, and 12, respectively: this is consistent with the magnitude of the H-bond donor property of substituents in this position.[8,10] The size and rigidity of these substituents are also likely to interfere: thus, the higher K_I value of **5** compared to **4** may be due to the fact that the isothiocyanate group, although smaller, is less flexible than the chloroacetamide group.

Similarly, the effect of substituting the *p*-position of ring A is evidenced by the K_I values of compounds **10**, **11** and **12**: the substitution of a hydrogen by a nitro-group and its transformation into an isothiocyanate group moderately influence the K_I value. Indeed, the total penalty for introducing this reactive group in this position is only a factor of 1.7; this position on ring A thus appears to be less sensitive to substitution than the corresponding position on ring B, in agreement with previous findings.[8,10]



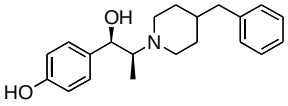
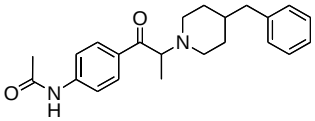
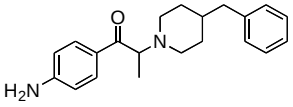
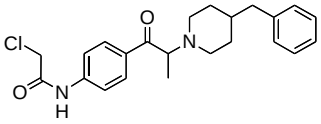
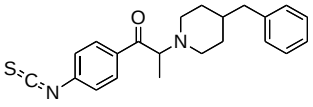
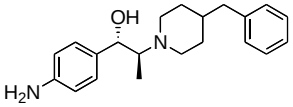
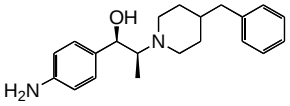
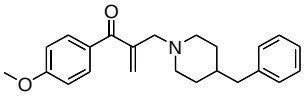
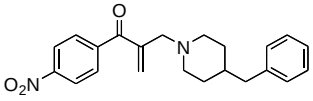
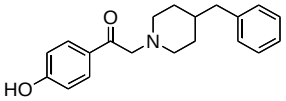
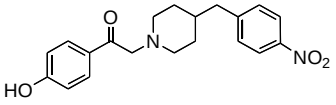
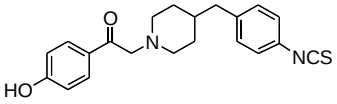
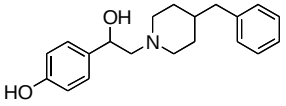
Scheme 1. Reagents and conditions: (i) $ClCOCH(CH_3)Br$, $AlCl_3$, CS_2, reflux, 17%; (ii) 4-benzylpiperidine, Et_3N, CH_3CN, reflux, 66%; (iii) HCl 37%, reflux, 89%; (iv) $ClCOCH_2Cl$, Et_3N, CH_2Cl_2, 0 °C, 69%; (v) $CSCl_2$, $NaHCO_3$, THF/H_2O 1:1, rt, 96%; (vi) $NaBH_4$, MeOH, 40 °C, 88%; (vii) CH_3I, K_2CO_3, acetone, reflux, 100%; (viii) HCHO, 4-benzylpiperidine, HCl, EtOH, reflux, 100%; (ix) silica gel heptane/ethyl acetate 1:1, 40%; (x) $(CF_3CO)_2O$, CH_2Cl_2, rt, 100%; (xi) HNO_3, CF_3COOH, −30 °C to rt, 37%; (xii) NaOH, EtOH, rt, 61%; (xiii) DBU, THF, rt, 84%; (xiv) H_2, Pd/C, MeOH/CH_2Cl_2 1:1, rt, 100%.

In our cysteine affinity labeling approach, one should apply to cysteine-substituted receptors only reactive ligands of well defined configuration, for a useful interpretation of their effect in terms of binding-site structure and ligand docking. Asymmetric centers generate mixtures of enantiomeric pairs. We therefore attempted to suppress the two asymmetric centers in the spacer arms while keeping as much as possible of their properties in length and polarity. With regard to the asymmetric carbon atom closest to ring B (α carbon), compounds (±) **6** and (±) **7** represent two diastereoisomeric pairs of enantiomers. Forming a ketone on this α carbon (instead of an alcohol function) shifts the K_I value from 97 to 58 nM (compounds (±) **7** and **3**). However, when there is no asymmetric center on the β carbon, the same change (from compound **13** to compound **10**) induces an opposite shift in K_I value, from 62 to 141 nM, while the suppression of the asymmetric center on the β carbon by the replacement of the linker's methyl group of ifenprodil **1** with a hydrogen atom, in **13**, produces à sixfold decrease in affinity, from a K_D value of 11.2 nM to a K_I value of 62 nM. In a racemic mixture, the presence of the less active compound decreases the apparent affinity of its isomer only modestly.[32] Similarly, the K_D for ifenprodil and the K_I values in Table 1 (compounds **2**, **3**, **4**, **5**, (±) **6**, (±) **7**, and **13**) are composite values. The maximum effect of the suppression of the two asymmetric centers of ifenprodil is a decrease in affinity by a factor of 13 (from ifenprodil to compound **10**), which is likely to confer to the achiral derivatives sufficient affinity to undergo functionalization for affinity labeling experiments. However, compounds **8** and **9** have no asymmetric center, but their high K_I values can also result from unfavourable substituents on ring B (the *p*-amino- or *p*-hydroxy-substituted compounds could not be isolated).

The stability of the reactive compounds **4**, **5**, **8**, **9** and different times, after dilution 1/10 in frog's Ringer **12**, were analyzed by HPLC: aliquots were injected, at buffer (pH 7.4) of a 10 mM stock solution in DMSO, and the time-dependent decrease of the peak area of each compound was followed. Their reactivity toward thiols was evaluated, using the same technique, by determining their half-life in the presence of excess of *N*-acetyl cysteine methyl ester (NACME). As the reaction rate varies linearly with the concentration of the reagents (pseudo-first order reaction), these were adjusted for an accurate measurement of the decay of the probes. Conditions and results can be found in Table 2. All five compounds react with thiols within minutes at the concentrations used; their stability in Ringer's buffer is appropriate for their use in receptor binding and activity assays. The compared reactivity of these compounds is consistent with their chemical structure: isothiocyanates react faster than chloroacetamides (**5** and **12** vs **4**) and, among Michael acceptors (both highly reactive), the electron attracting *p*-nitro substituent confers to **9** a 110-fold higher reactivity over **8**, in which electron-donor methoxy group is in the same position.

At submicromolar concentrations, ifenprodil selectively inhibits currents carried by NR1/NR2B receptors.[33] This high-affinity inhibition is non-competitive (toward the agonist glutamate) and does not depend on the transmembrane voltage (as expected for a binding site located outside the ionic channel). The biological activity of the reactive compounds in Table 2 was

Table 1. Binding data for ifenprodil and compounds **2**–**13**

Name or number	Compound	K_I[a]	Fold shift K_I^n/K_D^{ifen}
Ifenprodil (±) **1**[b]		11 ± 1.5[c]	1
2		107 ± 11	10
3		58 ± 5.3	5.3
4		493 ± 56	45
5		679 ± 34	62
(±) **6**[b]		300 ± 35	27
(±) **7**[b]		97 ± 10	8.8
8		527 ± 33	48
9		248 ± 44	23
10		141 ± 19	13
11		200 ± 14	18
12		245 ± 33	22
13		62 ± 8	16

[a] Values are given in nM ± SEM (n = 3).
[b] Ifenprodil, compounds **6** and **7** were tested as racemic erythro- or threo-derivatives (see text).
[c] K_D.

evaluated by performing two-electrode voltage-clamp measurements on Xenopus oocytes expressing wild-type NR1/NR2B receptors (ref 6). NMDA currents were induced by saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100 μM each), and the effects of the different compounds were assessed by measuring the change in current size induced by the application of the compound during a NMDA response. Com-

Table 2. Stability in buffer and reactivity versus thiols of reactive compounds

Compound	$t_{1/2}$ for stability	Reactivity			
		[Compound] (mM)	[NACME] (mM)	$t_{1/2}$ (min)	Relative reactivity
4	>1 day	0.1	500	114	
5	20 h	0.005	0.5	3.24	704×10^3
8	5 h	0.1	10	7	814
9	5 h	0.01	0.1	62	92×10^3
12	>1 day[a]	1	100	23	2.5

[a] An apparent decrease of concentration of compound **12** results from its slow precipitation in buffer, without the formation of degradation products.

Table 3. Activity of thiol-reactive ifenprodil derivatives at wild-type NR1/NR2B receptors

Compound	IC_{50} (μM)	$IC_{50}^{compound}/IC_{50}^{ifenprodil}$
1 (Ifenprodil)	0.11	1
4	14 ± 7 (n = 5)	130
8	70 ± 10 (n = 3)	640
12	16 ± 6 (n = 4)	145

pound **5**, which displayed the highest K_I value, showed only very weak inhibition of NR1/NR2B receptors (8% current inhibition with 10 μM of **5**). Compounds **4**, **8**, and **12** were much better at inhibiting NR1/NR2B receptors, with IC_{50}s of 14, 70, and 16 μM, respectively (Table 3). For comparison, in the same test, the IC_{50} for ifenprodil was found to be of 0.11 μM, a value very similar to what has been previously reported.[6] When tested by electrophysiology, the compounds appear less potent compared to binding studies, as their activity is decreased by at least two orders of magnitude compared to ifenprodil. Moreover, compounds **4** and **12** show similar IC_{50}s, whereas their K_I values are twofold different. However, a general trend is followed: the derivatives which have the lowest K_I value also have the lowest IC_{50}. Surprisingly, compound **9** was found to be inactive, since it had no effect on NMDA responses at 10 μM. The example of compound **9** suggests the existence of NR2B-NTD compounds functionally 'silent', that is, compounds unable to modulate the receptor activity in spite of their ifenprodil-competitive binding.

To ascertain that the inhibitory effects seen with the compounds were specific to the NR2B subunit and engaging the NR2B NTD, we repeated some of the above experiments on oocytes expressing either wild-type NR1/NR2A receptors or NR1/NR2B receptors truncated for the entire NR2B-NTD (NR1/N2B ΔNTD; see Ref. 14). As expected for compounds targeting selectively the NR2B NTD, compounds **4**, **8**, and **12** have little effects on NR1/NR2A receptors with EC_{50}s estimated to be >100 μM (25% [n = 3] and 11% [n = 3] inhibition for compounds **4** and **8** at 100 μM). The IC_{50} for compound **12** was shifted from 16 (NR2B, n = 4) to 150 μM (NR2A, n = 5) and became voltage dependent, as expected if the observed inhibition on NR1/NR2A receptors is mostly due to channel block by the compound.[6] When the NTD segment was truncated from the NR2B subunit, similar rightward shifts were observed for compounds **12** (IC_{50} = 570 μM, [n = 4], voltage dependent) and **4** (IC_{50} = 230 μM [n = 3]); compound **8** was found inactive, as with the NR2A subunit (no effect up to 100 μM). Altogether, these results show that the synthesized compounds have a common and subunit-specific target on NMDARs, the NR2B NTD.

In summary, we have synthesized ifenprodil-derived compounds to design NR2B selective ligands with a reactive group in different parts of the molecule. These ligands were assayed for their ability to be recognized by the ifenprodil binding site and to produce the expected NR2B-NTD mediated allosteric antagonism of NMDAR mediated currents. Characterized as stable in buffer but reactive with thiol groups, these compounds, like ifenprodil, present a pharmacological profile consistent with their specific binding to the modulatory NTD of the NR2B subunit. Although these compounds displayed a decreased potency compared to ifenprodil, they appear to be valuable tools for a further characterization of the ifenprodil binding site, its topological analysis, and the docking of cognate ligands.

Acknowledgments

We wish to thank the Roche Company for the kind gift of Ro-084304 as well as the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Louis Pasteur, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, the Agence Nationale de la Recherche and the Ministère de la Recherche et de la Technologie for their material and financial support.

References and notes

1. Cull-Candy, S. G.; Brickley, S.; Farrant, M. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 32.
2. Paoletti, P.; Neyton, J. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2007**, *7*, 39.
3. Chizh, B. A.; Headley, P. M.; Tzschentke, T. M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 636.
4. Parsons, C. G. *Eur. J. Pharmacol.* **2001**, *429*, 71.
5. Kemp, J. A.; McKernan, R. M. *Nat. Neurosc.* **2002**, *5*, 1039.
6. Perin-Dureau, F.; Rachline, J.; Neyton, J.; Paoletti, P. *J. Neurosci.* **2002**, *22*, 5955.
7. Malherbe, P.; Mutel, V.; Broger, C.; Perin-Dureau, F.; Kemp, J. A.; Neyton, J.; Paoletti, P.; Kew, J. N. C. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *307*, 897.

8. Chenard, B. L.; Menniti, F. S. *Curr. Pharm. Des.* **1999**, *5*, 381.
9. Kornberg, B. E.; Nikam, S. S.; Wright, J. L.; Kesten, S. R.; Meltzer, L. T.; Coughenour, L.; Barr, B.; Serpa, K. A.; McCormick, J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *5*, 1213.
10. Nikam, S. S.; Meltzer, L. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 845.
11. Masuko, T.; Kashiwagi, K.; Kuno, T.; Nguyen, N. D.; Pahk, A. J.; Fukuchi, J.; Igarashi, K.; Williams, K. *Mol. Pharmacol.* **1999**, *55*, 957.
12. Paoletti, P.; Perin-Dureau, F.; Fayyazuddin, A.; LeGoff, A.; Callebaut, I.; Neyton, J. *Neuron* **2000**, *28*, 911.
13. Rachline, J.; Perin-Dureau, F.; Le Goff, A.; Neyton, J.; Paoletti, P. *J. Neurosci.* **2005**, *25*, 308.
14. Herin, G. A.; Aizenman, E. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *500*, 101.
15. Hawkins, L. M.; Chazot, P. L.; Stephenson, F. A. *Br. J. Pharmacol.* **1999**, *1p*, 126.
16. Gallagher, M. J.; Huang, H.; Pritchett, D. B.; Lynch, D. R. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9603.
17. Wong, E.; Ng, F. M.; Yu, C. Y.; Lim, P.; Lim, L. H.; Traynelis, S. F.; Low, C. M. *Protein Sci.* **2005**, *14*, 2275.
18. Foucaud, B.; Perret, P.; Grutter, T.; Goeldner, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 170.
19. Foucaud, B.; Laube, B.; Schemm, R.; Goeldner, M.; Betz, H. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 24011.
20. Kreimeyer, A.; Laube, B.; Sturgess, M.; Goeldner, M.; Foucaud, B. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 4394.
21. Furukawa, H.; Gouaux, E. *EMBO J.* **2003**, *22*, 2873.
22. Foucaud, B.; Alarcon, K.; Sakr, E.; Goeldner, M. *Curr. Chem. Biol.* **2007**, *1*, 271.
23. Tamiz, A. P.; Whittemore, E. R.; Zhou, Z. L.; Huang, J. C.; Drewe, J. A.; Chen, J. C.; Cai, S. X.; Weber, E.; Woodward, R. M.; Keana, J. F. W. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 3499.
24. Gershon, H.; Scala, A.; Parmegiani, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, *8*, 877.
25. Cromwell, N. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1946**, *68*, 2634.
26. Girreser, U.; Heber, D.; Schütt, M. *Synthesis* **1998**, 715.
27. Givens, R. S.; Park, C.-H. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6259.
28. Imamura, S.; Nishikawa, Y.; Ichikawa, T.; Hattori, T.; Matsushita, Y.; Hashiguchi, S.; Kanzaki, N.; Iizawa, Y.; Baba, M.; Sugihara, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 397.
29. HPLC retention time on a Analytical C18 Acclaim (4.6 × 300 mm) column using a 30 min linear gradient from 0% to 50% acetonitrile in 0.1% TFA water solution at 1 ml/min, for compounds **4** and **12**, and 20 min similar linear gradient for compounds **8** and **9**: 22.7, 25.5, 20.6 and 19.9 min, respectively. For compound **5**, the linear gradient was as for compounds **4** and **12**, except for the acetonitrile concentration, from 20% to 70%; retention time: 24.7 min.
30. Mutel, V.; Buchy, D.; Klingelschmidt, A.; Messer, J.; Bleuel, Z.; Kemp, J. A.; Richards, J. G. *J. Neurochem.* **1998**, *70*, 2147.
31. Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099.
32. Avenet, P.; Léonardon, J.; Besnard, F.; Graham, D.; Frost, J.; Deporteere, H.; Langer, S. Z.; Scatton, B. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *296*, 209.
33. Williams, K. *Mol. Pharmacol.* **1993**, *44*, 851.

5.3 Article II

Structural Basis of NR2B-selective Antagonist Recognition by N-Methyl-D-aspartate Receptors

Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Leonetti, Anne Le Goff, Karine Alarcon, Jacques Neyton, Hugues-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti

Molecular Pharmacology 75: 60–74, 2009

Supplemental Material can be found at:
http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/content/full/mol.108.050971/DC1

0026-895X/09/7501-60–74$20.00
MOLECULAR PHARMACOLOGY
Vol. 75, No. 1
50971/3420800
Mol Pharmacol 75:60–74, 2009
Printed in U.S.A.
Copyright © 2009 The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

MOL PHARM

Structural Basis of NR2B-Selective Antagonist Recognition by *N*-Methyl-D-aspartate Receptors[S]

Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Leonetti,[1] Anne Le Goff, Karine Alarcon, Jacques Neyton, Hughes-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti

Laboratoire de Neurobiologie, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) Unité Mixte de Recherche (UMR) 8544, Ecole Normale Supérieure, Paris, France (L.M., L.K., M.L., A.L.G., J.N., P.P.); Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques, CNRS UMR 8601, Université Paris Descartes, Paris, France (L.M., L.K., F.A.); Laboratoire de Chimie Bioorganique, CNRS UMR 7175, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur de Strasbourg, Illkirch, France (K.A.), Accelrys, Parc Club Orsay Université, Orsay, France (H.-O.B.)

Received July 31, 2008; accepted October 14, 2008

ABSTRACT

N-Methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are ionotropic glutamate receptors endowed with unique pharmacological and functional properties. In particular, their high permeability to calcium ions confers on NMDARs a central role in triggering long term changes in synaptic strength. Under excitotoxic pathological conditions, such as those occurring during brain trauma, stroke, or Parkinson's or Huntington's diseases, calcium influx through NMDAR channels can also lead to neuronal injury. This argues for the use of NMDAR antagonists as potential therapeutic agents. To date, the most promising NMDAR antagonists are ifenprodil and derivatives, compounds that act as noncompetitive inhibitors selective for NMDARs containing the NR2B subunit. Recent studies have identified the large N-terminal domain (NTD) of NR2B as the region controlling ifenprodil sensitivity of NMDARs. We present here a detailed characterization of the ifenprodil binding site using both experimental and computational approaches. 3D homology modeling reveals that ifenprodil fits well in a closed cleft conformation of the NRB NTD; however, ifenprodil can adopt either of two possible binding orientations of opposite direction. By studying the effects of cleft mutations, we show that only the orientation in which the phenyl moiety points deep toward the NTD hinge is functionally relevant. Moreover, based on our model, we identify novel NTD NR2B residues that are crucial for conferring ifenprodil sensitivity and provide functional evidence that these residues directly interact with the ifenprodil molecule. This work provides a general insight into the origin of the subunit-selectivity of NMDAR noncompetitive antagonists and offer clues for the discovery of novel NR2B-selective antagonists.

NMDA receptors (NMDARs) are glutamate-gated ion channels widely expressed in the central nervous system that mediate a component of excitatory synaptic transmission. NMDARs are essential for normal physiological processes, such as brain development, synaptic plasticity, learning, and memory (Dingledine et al., 1999). NMDARs are also involved in many brain disorders, triggering an intense interest as potential therapeutic targets. They are best known for their role in excitotoxicity, a process during which excessive glutamate release causes overactivation of NMDARs, accumulation of intracellular calcium and, eventually, neuronal death. Excitotoxicity occurs during many acute (brain trauma, stroke) and chronic neurodegenerative disorders (Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's diseases). Overactivity of NMDARs is also observed in epilepsy and chronic pain (Kemp and McKernan, 2002). To counteract the deleterious effects of NMDAR overactivation, extensive efforts have been made to discover potent and selective NMDAR antagonists. In the 1980s, the first compounds to be developed were competitive antagonists and high-affinity channel blockers. However, despite good efficacy against neuronal injury, most of these early NMDARs antagonists failed in clinical trials because of unacceptable side effects including hallucinations, drowsiness, memory, and motor deficits (Kemp and McKernan, 2002). One likely explanation for the failure of these first-generation NMDAR antagonists is their lack of subunit specificity. By targeting the agonist-binding domain (competitive antagonists) or the

This work was supported by Ministère de la Recherche (to L.M.) and by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale and l'Agence Nationale de la Recherche (to P.P.)

[1] Current affiliation: Laboratory of Molecular Neurobiology and Biophysics, Rockefeller University and Howard Hughes Medical Institute, New York, New York.

Article, publication date, and citation information can be found at http://molpharm.aspetjournals.org.
doi:10.1124/mol.108.050971.

[S] The online version of this article (available at http://molpharm.aspetjournals.org) contains supplemental material.

ABBREVIATIONS: NMDAR, *N*-methyl-D-aspartate receptor; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NTD, N-terminal domain; LIVBP, leucine/isoleucine/valine-binding protein; 3D, three-dimensional; wt, wild type; ABD, agonist-binding domain.

MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet

ion pore (channel blockers), these compounds do not discriminate between the various NMDAR subtypes and cause generalized inhibition of NMDAR activity.

In vivo, NMDARs occur as multiple subtypes most often composed of NR1 and NR2 subunits. They form heterotetrameric complexes made of two NR1 and two NR2 subunits. Although NR1 is encoded by a single gene, the NR2 subunit exists as four subtypes encoded by four different genes (NR2A-D), each with a distinctive spatiotemporal pattern of expression. Different subunit composition imparts different biophysical and pharmacological properties (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Paoletti and Neyton, 2007). One of the most exciting recent developments in NMDAR pharmacology has been the identification of highly subtype-selective antagonists that act allosterically (in a noncompetitive manner). As a matter of fact, these agents are much better tolerated compared with broad-spectrum NMDAR antagonists (Kemp and McKernan, 2002). The most promising subtype selective compounds are ifenprodil and derivatives, a large family of synthetic compounds that selectively inhibit NMDARs containing the NR2B subunit (Williams, 1993; Mott et al., 1998; Hatton and Paoletti, 2005). Among them, several highly potent molecules show good efficacy as neuroprotectants and/or painkillers in a variety of animal models (Chizh et al., 2001; Chazot, 2004; Gogas, 2006). It is noteworthy that in humans, NR2B-selective antagonists do not induce the adverse side effects usually seen with nonselective NMDAR antagonists, even at maximally neuroprotective doses (Chizh et al., 2001; Gogas, 2006). Despite these encouraging data, NR2B-selective antagonists have not succeeded in clinical trials yet because of poor oral bioavailability and pharmacokinetic profiles (Kew and Kemp, 2005). Thus, new potent NR2B-selective antagonists are still in great demand.

The ifenprodil binding site on NMDARs has been mapped to the N-terminal domain (NTD) of the NR2B subunit (Gallagher et al., 1996; Perin-Dureau et al., 2002; Malherbe et al., 2003). The NTD, composed of the first ~380 amino acids, is present in all eukaryotic ionotropic glutamate receptor subunits and participates in subunit assembly (Mayer, 2006). In NR2A and NR2B subunits, the NTD also forms a modulatory domain binding the Zn^{2+} ion, which acts as an endogenous allosteric inhibitor of NMDARs (Choi and Lipton, 1999; Low et al., 2000; Paoletti et al., 2000; Rachline et al., 2005; Gielen et al., 2008). NR2A and NR2B NTDs form discrete modules because they are still capable of binding zinc or ifenprodil when produced in isolation from the remainder of the receptor complex (Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005; Wong et al., 2005). NMDAR NTDs share weak sequence similarity with some bacterial periplasmic binding proteins like LIVBP (leucine/isoleucine/valine-binding protein; Masuko et al., 1999; Paoletti et al., 2000). Their structure has not been determined yet, but they are thought to fold as two lobes separated by a hinge, similarly to LIVBP. Using a mutagenesis approach, Perin-Dureau et al. (2002) suggested that ifenprodil binds in the central interlobe cleft of NR2B NTD and promotes cleft closure through a hinge-bending motion (Venus Flytrap mechanism). However, despite the plentiful production of ifenprodil-derived NR2B-selective antagonists (Chenard and Menniti, 1999; Nikam and Meltzer, 2002), the binding mode of ifenprodil and its derivatives on NR2B NTD remains ill defined. It is unclear which of the NTD residues directly interact with the ligand and what is the structural basis for the subtype-selective pharmacology conferred by the NTDs. Marinelli et al. (2007) proposed a model of ifenprodil binding into NR2B NTD; because no experimental validation was performed, however, it remains a theoretical proposal. In this study, we combine molecular modeling and functional approaches to provide a realistic 3D model of the NR2B NTD-ifenprodil complex.

Materials and Methods

Molecular Biology

The pcDNA3-based expression plasmids for rat NR1-1a (named NR1 herein), rat NR2A, and mouse ε2 (named NR2B herein), the mutagenesis strategy, the sequencing and the RNA synthesis have been described previously (Paoletti et al., 1997, 2000; Rachline et al., 2005)

Electrophysiology

Recombinant NMDA receptors were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after coinjection of 30 nl of a mixture of cDNAs (10 ng/μl; nuclear injection) or cRNAs (10–100 ng/μl) coding for wild-type NR1-a and various NR2B subunits (ratio 1:1). Oocytes were prepared, injected, voltage-clamped and superfused as described previously (Paoletti et al., 1997). The standard external solution contained 100 mM NaCl, 0.3 mM $BaCl_2$, 5 mM HEPES, and 2.5 mM KOH. The pH was adjusted to 7.3 with HCl. NMDA currents were induced by simultaneous application of saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100 μM each) and recorded at −60 mV. Zinc solutions were obtained by diluting in the agonist solution a 100 mM $ZnCl_2$ stock-solution prepared in 0.1 N HCl. In these solutions, zinc was not buffered, and the control zinc-free solution was made by adding 10 μM diethylenetriamine-pentaacetic acid to chelate trace amounts of contaminant zinc (Paoletti et al., 1997). Ifenprodil was prepared as 100-μl aliquots (in bidistilled water) at 10 mM and stored at −20°C. For pH sensitivity experiments, solutions were prepared according to Gielen et al. (2008). When performing pH dose-response curves, at very alkaline pH values, glutamate and glycine concentrations were adjusted to compensate for the loss of protonation of the α-amino moiety ($pK_a \sim 9.7$ for both L-glutamate and glycine). Thus, for pH of 9.3 and 10.3, glutamate and glycine concentrations were increased by 1.4- and 5-fold, respectively. All experiments were performed at room temperature.

Data Analysis

Data were collected and analyzed using pClamp 9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). They were fitted using Sigmaplot 8.0 (SSPS, Chicago, IL). For ifenprodil dose-response curves, experimental points were fitted using the following Hill equation: $I_{ifen}/I_{control} = 1 - a/(1 + (IC_{50}/[ifen])^{n_H})$, where $I_{ifen}/I_{control}$ is the mean relative current, [ifen] is the ifenprodil concentration, IC_{50} is the concentration of ifenprodil producing 50% of the maximal inhibition, n_H is the Hill coefficient, and a is the maximal inhibition at the saturating ifenprodil concentration. IC_{50}, a, and n_H were set as free parameters. Zinc dose-response curves were fitted using the following Hill-derived equation: $I_{zinc}/I_{control} = 1 - a/(1 + (IC_{50}/([Zn] + b))^{n_H})$, where b is the contaminant zinc concentration and [Zn] the added zinc concentration. Following Rachline et al. (2005), b was set to 100 nM. pH dose-response curves were analyzed according to Gielen et al. (2008). Error bars represent the standard deviation of the mean of relative currents.

Cysteine Affinity Labeling

N-{4-[2-(4-Benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide (molecule 4 from Alarcon et al., 2008) was prepared at 500 mM in anhydrous dimethyl sulfoxide. Initial agonist response (I_0) was measured in oocytes. Then, each oocyte was removed from the re-

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

cording chamber and incubated in a 100 μl of Barth solution [88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.33 mM $Ca(NO_3)_2$, 0.41 mM $CaCl_2$, 0.82 mM $MgSO_4$, 2.4 mM $NaHCO_3$, and 10 mM HEPES; pH adjusted to 7.6 with NaOH] containing gentamicin (50 μg/μl), glutamate (100 μM), 5,7-dichlorokynurenic acid (40 μM), and a 500 μM concentration of the reactive ifenprodil derivative (*N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide). After a 30-min incubation at room temperature, oocytes were washed for 1 min in a Barth solution containing gentamicin (50 μg/μl). We verified that, on wild-type (wt) NR1/NR2B receptors, 1 min of wash-out was sufficient for a near recovery of the initial agonist-induced response after an application of 500 μM *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide. Then agonist response was measured again (I_{incub}). The ratio I_{incub}/I_0 is reported for each oocyte. Error bars represent the standard error of the mean ratio I_{incub}/I_0.

In preliminary control experiments, we observed that incubation in 500 μM *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide induced a decrease of the NMDA response carried by wt NR1/NR2B receptors ($I_{incub}/I_0 = 0.35 \pm 0.06$; $n = 6$). An endogenous cysteine, C232, is located in the vicinity of the ifenprodil binding-site of NR2B and could possibly react with *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide. However, a similar I_{incub}/I_0 ratio was found for NR1wt/NR2B-C232A receptors, showing that the irreversible inhibition seen on wt receptors was not due to irreversible labeling of this NTD cleft cysteine. This hypothesis was confirmed by incubating oocytes expressing wt NR1/NR2B receptors in a 100 μM concentration of the nonreactive ifenprodil molecule, which also yielded a strong decrease in the NMDA response ($I_{incub}/I_0 = 0.10 \pm 0.04$; $n = 10$) [In this experiment, because of the slow wash-out of ifenprodil inhibition (Perin-Dureau et al., 2002), oocytes were washed for 10 min after incubation in ifenprodil.] In contrast, incubation in 100 μM ifenprodil induced very little irreversible inhibition of receptors truncated for the entire NR2B NTD (NR1wt/NR2B-ΔNTD) ($I_{incub}/I_0 = 0.9 \pm 0.1$; $n = 5$) or of receptors containing a single strong ifenprodil binding mutation (NR1/NR2B-D101A or NR1/NR2B-V262D receptors; data not shown). Therefore, at high concentrations, ifenprodil and derivatives can induce an NTD-dependent irreversible inhibition of NR2B-containing NMDARs without involving any covalent binding of these molecules. The magnitude of this noncovalent irreversible effect was found to depend on the affinity of the receptor for the ifenprodil derivative (data not shown).

Molecular Modeling Studies

Homology Modeling of NR2B NTD. A sequence alignment of rat NR2A and NR2B NTDs with the agonist-binding domain of mGluR1 was generated according to Malherbe et al. (2003) and further refined using predicted (NR2A and NR2B) and known (mGluR1 agonist-binding domain; PDB code 1ewk:A) secondary structures. Secondary structure elements of NR2A and NR2B NTDs were predicted using PROF predictions (http://www.predictprotein.org; Rost and Sander, 1993). Homology models for NR2B NTD were generated by the automated comparative modeling tool MODELER 9.0 (DS Modeling 1.7; Accelrys, San Diego, CA) as described previously (Bertrand et al., 2002). Models were generated by using the coordinates of the mGluR1 agonist-binding domain closed form (PDB code 1ewk:A) and based on the sequence alignment described in Fig. 1. The structural quality of the models was assessed according to the MODELER probability density functions as well as Profiles-3D analysis (DS Modeling 1.7). Loops were refined using MODELER. The final selected model was used for docking.

Docking of Ifenprodil in the Model of NR2B NTD. Ifenprodil was docked using LigandFit (Venkatachalam et al., 2003) (DS Modeling 1.7). In such a process, the protein is kept rigid while the ligands undergo Monte Carlo conformational searching. Twenty poses were generated, clustered, and selected according to their binding mode.

Docking Refinement of Ifenprodil in NR2B NTD. The obtained protein–ligand complexes were submitted to energy minimization while tethering the Cα trace. This was performed using the CHARMm calculation engine (Brooks et al., 1983; DS Modeling version 1.7). CHARMm was also used to perform 1 ns of molecular dynamics at 298 K. Once the system was equilibrated, snapshots were collected, averaged, and submitted again to energy minimization (Bertrand et al., 2002).

Qualitative Pharmacophore Models Generation. Five molecules that had the same activity as ifenprodil were selected. The pharmacophore models were generated by using the qualitative common feature pharmacophore HipHop algorithm (Barnum et al., 1996) of Catalyst 4.11 (Accelrys).

Results

Molecular Modeling of the N-Terminal Domain of NR2B and Docking of Ifenprodil. We built a 3D model of the NTD of NR2B using the atomic coordinates of the closed agonist-binding domain (ABD) of the metabotropic glutamate receptor mGluR1 as a template (PDB code 1EWK:A; Kunishima et al., 2000). mGluR1 ABD is indeed another LIVBP-like protein that shares slightly more sequence identity with NR2B NTD than LIVBP does [~12% identity for rat NR2B NTD (protein ID Q00960.1)/rat mGluR1 ABD (protein ID P23385.1) versus ~9% for NR2B NTD/LIVBP (PDB code 2liv_A)]. 3D models were generated using the alignment shown in Fig. 1. Because the sequence identity between the NR2B NTD and mGluR1 ABD is very low (~12%), we based our alignment according to known (mGluR1 ABD) and predicted (NR2B NTD) secondary structure elements (Fig. 1). In the loops putatively lining the central cleft of NR2B NTD (Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005), we also stipulated that residues previously shown to control zinc and/or ifenprodil inhibition should be aligned with residues pointing toward the glutamate binding cleft of mGluR1 ABD. This is obviously a strong constraint. Consequently, we took special care in our subsequent functional experiments to assay the role of these residues pointing toward the NR2B NTD cleft.

The structural quality of the generated 3D models was assessed according to the MODELER probability density functions (PDF energy), as well as Profiles-3D analysis (P3D score). The structural quality of the models was further improved by individually refining loops lining the binding cleft. The final NR2B NTD model showed a P3D score of 151.66 over 166.35 (91% of the maximal expected score) and exhibited no misfolded region around the binding cleft, attesting to the overall goodness of the chosen model. We also verified that, in addition to its high score, this model showed a good concordance to the imposed constraint (residues controlling zinc and/or ifenprodil sensitivity pointing toward the interlobe cleft of the NTD). This was indeed the case (Fig. 2). However, because the sequences of the NR2B NTD and mGluR1 ABD share such a low sequence identity, the orientations of residues side-chains are rather imprecise. Thorough functional validation of this model is therefore mandatory to confirm its biological relevance.

We then docked ifenprodil in erythro configuration, the synthesis of ifenprodil being diastereoselective (Avenet et al., 1996), into the interlobe cleft of the modeled NR2B NTD, using LigandFit (see *Materials and Methods*). Docking experiments did not reveal a unique binding mode for ifenprodil. Rather, we found that ifenprodil could bind to the NTD of NR2B with two opposite orientations: with its phenol group

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

close to the entrance of the cleft and its benzyl group contacting the interlobe hinge (orientation 1) or vice versa (orientation 2). Each orientation was further refined by 1 ns of molecular dynamics (see *Materials and Methods*), to yield the two models shown in Fig. 2 (Fig. 2A with orientation 1; Fig. 2B with orientation 2). In both models, ifenprodil binds in extended conformations that correspond to low-energy conformations in the solvent. Moreover, the ifenprodil molecule makes interactions with both lobes.

We next sought to verify that the conformations of ifenprodil found after molecular dynamics in both orientations were likely to be bioactive conformations. Indeed, ifenprodil is a flexible molecule and the conformation with which it actually binds to the NTD is unclear. The bioactive conformation of a ligand can be predicted by the use of qualitative common feature pharmacophore models (Barnum et al., 1996). A common feature pharmacophore model describes the 3D arrangement of the shared electronic properties required

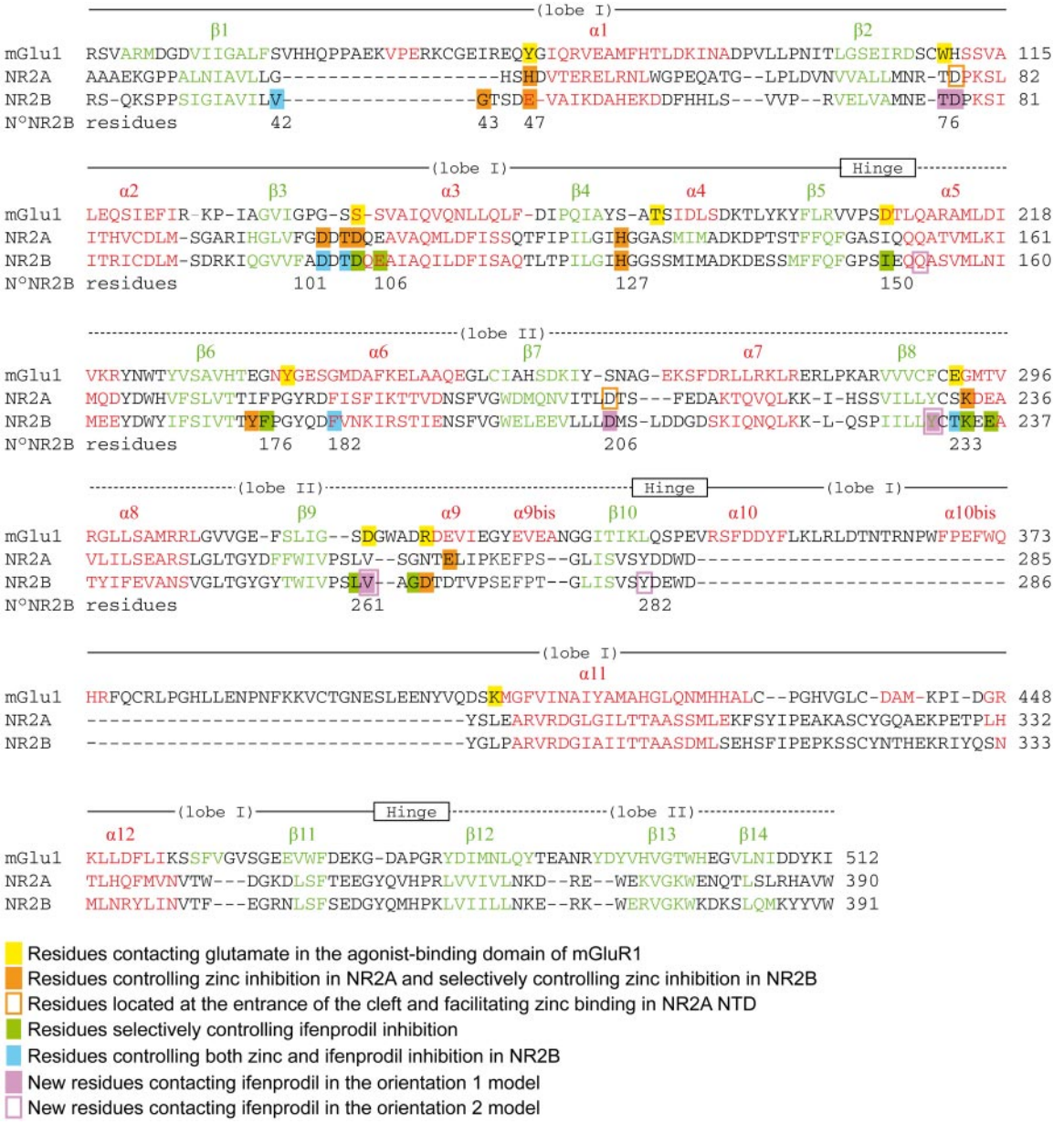
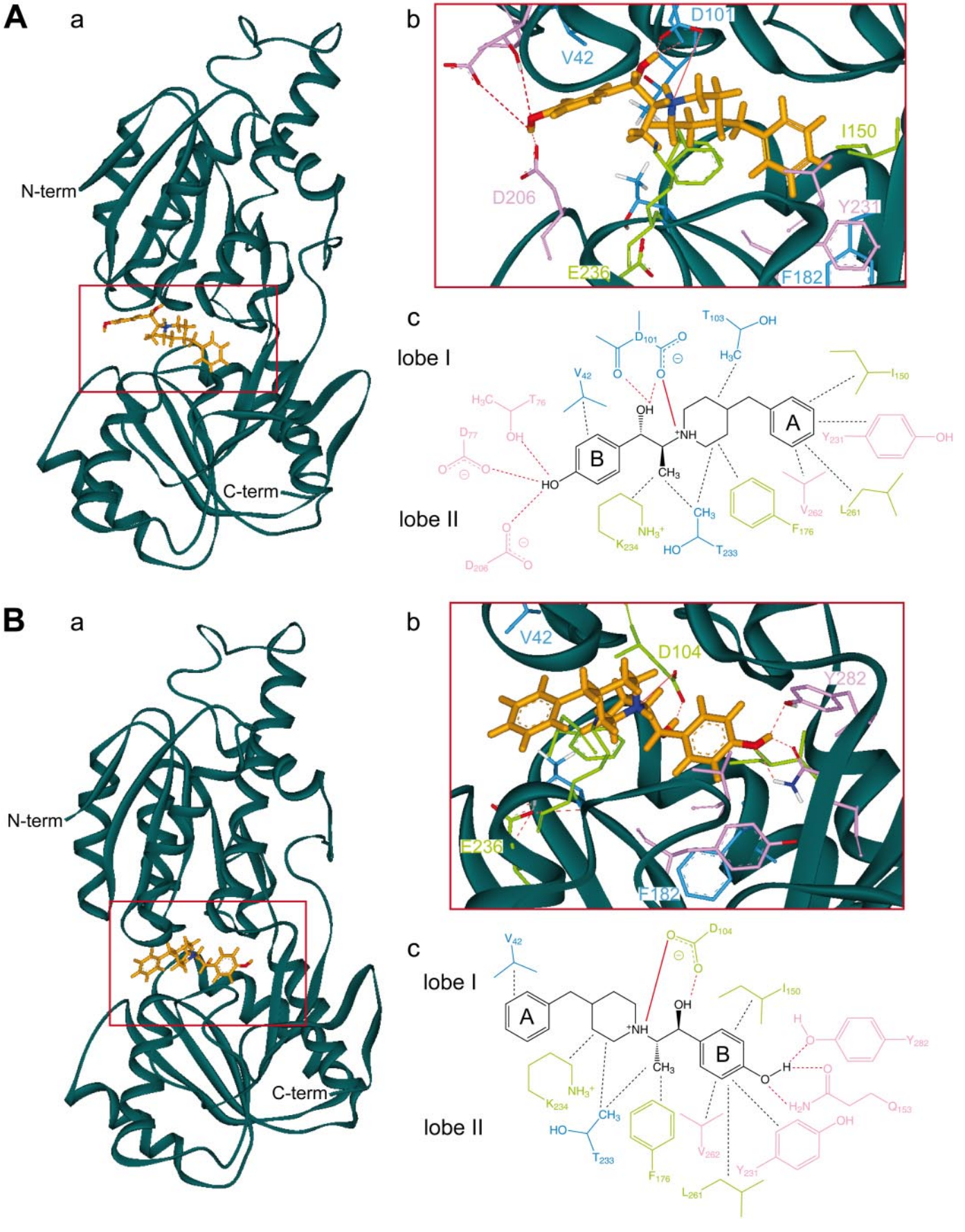


Fig. 1. Sequence alignment of NR2A and NR2B NTDs with the agonist-binding domain of mGluR1. The indicated α-helices (red) and β-strands (green) of mGluR1 are from the X-ray structure of the agonist-binding domain of mGluR1 (PDB 1ewk:A) (Kunishima et al., 2000). Secondary structure elements of NR2A and NR2B NTDs were predicted using PROF predictions (see *Materials and Methods*). Yellow closed boxes correspond to residues of mGluR1 contacting the glutamate molecule in mGluR1 ABD X-ray structure (Kunishima et al., 2000), orange closed boxes to residues of NR2A controlling high-affinity zinc inhibition and to residues of NR2B controlling zinc inhibition and not ifenprodil inhibition (Paoletti et al., 2000 and Rachline et al., 2005), green closed boxes to residues of NR2B selectively controlling ifenprodil inhibition (Perin-Dureau et al., 2002), blue closed boxes to residues of NR2B controlling both ifenprodil and zinc inhibition (Rachline et al., 2005). Mutations into alanine of these highlighted NR2A and NR2B residues all result in a decrease of zinc and/or ifenprodil sensitivity, except for Val42, which decreases ifenprodil sensitivity but increases zinc sensitivity (see Rachline et al., 2005). In NR2A, residues located at the entrance of the NTD central cleft, proposed as residues providing a favorable electrostatic environment for zinc to access the cleft (Paoletti et al., 2000), are depicted in orange open boxes. In NR2B, newly identified residues contacting ifenprodil in the docking models (see *Results*) are depicted in pink closed boxes (orientation 1) and pink open boxes (orientation 2). Note that despite the conserved pattern of secondary structure elements (alternation of β-strands and α-helices), the sequence identity between mGluR1 ABD and NR2B (or NR2A) NTD is very low (~12%).

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet



Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

MOL PHARM

MOLECULAR PHARMACOLOGY

for the activity of a set of molecules on their receptor. To build the pharmacophore model of ifenprodil-like molecules, we used a dataset of five molecules having similar activities to ifenprodil on wt NR1/NR2B receptors (see Supplementary Table S1). To obtain a relevant pharmacophore model, we chose rigid molecules with distinct chemical structures. The presence of molecules more rigid than ifenprodil, like those containing an acetylenic linker (second and third molecules of Table S1), is important to limit the number of 3D arrangements of the different pharmacophore features. From this data set, several pharmacophore models were generated, and we selected the pharmacophore with the highest rank. We obtained a four-point pharmacophore composed of two aromatic, one positive ionizable, and one H-bond donor features (Fig. 3A). The pharmacophore model obtained is consistent with the previously published structure-activity relationship data (Tamiz et al., 1998; Chenard and Menniti, 1999; and see *Ifenprodil Interactions in Its Binding Pocket*) and predicts an extended conformation of ifenprodil. The two conformations of ifenprodil found after molecular dynamics (orientations 1 and 2) were then mapped to the pharmacophore model. As shown in Fig. 3, B and C, both conformations closely matched the pharmacophore. The conformations of ifenprodil found in the docking models are therefore likely to be both bioactive conformations. Which of the two orientations of ifenprodil is the actual bioactive one remains to be elucidated.

Ifenprodil Interactions in its Binding Pocket. Investigations of the structure-activity relationships of ifenprodil derivatives have established that there are common important structural features for this family of compounds (Tamiz et al., 1998; Chenard and Menniti, 1999). There are four features: 1) a phenyl moiety (ring A) interacting with a hydrophobic pocket; 2) a positively charged central nitrogen atom that can make ionic or charge-dipole interactions with a H-bond acceptor; 3) a second phenyl group (ring B) coupled with a H-bond donor that can make both hydrophobic and polar interactions; and 4) 10 to 12 Å separating ring A from ring B (linker region). It is noteworthy that the two models described above obey these structural requirements. Moreover, they are overall consistent with the previously published mutagenesis data (Perin-Dureau et al., 2002). Indeed, two of the four residues found to have a strong effect on ifenprodil sensitivity after mutagenesis (Ile150, Phe176; IC_{50} more than 60-fold higher than for wt NR2B-containing receptors) are found to be in direct atomic contact with the ifenprodil molecule, irrespective of the orientation 1 or 2 model (Fig. 2). The third residue, Asp101, also directly interacts with ifenprodil in model 1 but not in model 2, where it is farther apart from the ligand. Finally, the fourth residue, Phe182, is buried in lobe II and cannot contact ifenprodil (Fig. 2). However, this residue has been shown to control sensitivity of NR1/NR2B receptors to both ifenprodil and zinc (Rachline et al., 2005), two NR2B NTD ligands of very different chemical nature, indicating that it might be involved in the global structuring of the NTD. Moreover, Phe182 interacts with Tyr231, a residue that directly interacts with ifenprodil (see below). Thus, in addition to its global structural role, Phe182 may also control ifenprodil binding in an indirect manner, via the correct positioning of Tyr231.

In both orientations, ifenprodil shares common hydrophobic interactions with the receptor. Thus, the aromatic ring close to the hinge of the NR2B NTD is in a hydrophobic pocket composed mostly of Ile150, Tyr231, Leu261, and Val262 side chains (Fig. 2). The direct interaction between Ile150 and ifenprodil fits well with the finding that mutation of Ile150 into a shorter alanine strongly and selectively affects ifenprodil inhibition (inhibition by zinc, the other NR2B NTD ligand, is not affected; Rachline et al., 2005). A similar situation applies for Leu261, a residue that interacts with ifenprodil through its side chain Cβ. In contrast, mutation Val262A was shown to have only a modest effect on ifenprodil sensitivity (Perin-Dureau et al., 2002), a result that, at first sight, seems difficult to reconcile with our observation that Val262 directly contacts ifenprodil in the models. However, it is possible that the effect of the valine-to-alanine mutation is absent because this mutation does not change the polarity of the residue, and therefore has little impact on ifenprodil binding. Obviously, additional substitutions of Val262 need to be tested to validate this interaction (see below).

Tyr231 is another residue contacting the ifenprodil aromatic group in the hinge region. In fact, in both orientation 1 and 2 models, Tyr231 seems to be engaged in multiple interactions not only with the ligand but also with other residues controlling ifenprodil sensitivity such as Leu261, Ile150, and Phe182 (through π-stacking or Van der Waals interactions). The effects of mutations at NR2B-Tyr231 on ifenprodil sensitivity have not been reported so far. From our models, we expect substitutions at this position to significantly affect ifenprodil inhibition (see below).

At the entrance of the cleft, the aromatic ring of the ifenprodil molecule, in both models, is contacting valine 42, which was also found to exert some control of ifenprodil inhibition (Perin-Dureau et al., 2002). Moreover, the aliphatic chain linking the two aromatic moieties is making Van

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

Fig. 2. Ifenprodil can bind NR2B NTD with two possible orientations. A, orientation 1. a) 3D model of ifenprodil binding into the NTD of NR2B in orientation 1 with ifenprodil B ring close to the entrance of the cleft and ring A contacting the interlobe hinge (see *Results*). The NTD α-carbon backbone is displayed as a dark green ribbon. Ifenprodil is displayed as sticks (carbons and hydrogens in orange, nitrogen in dark blue and oxygens in red). b) Expanded view of the binding of ifenprodil in orientation 1, showing its interactions with residues of the NTD interlobe cleft. Noncarbon atoms are displayed as follows: hydrogens in white, nitrogens in dark blue, and oxygens in red. Only polar hydrogens and hydrogens of threonine methyl groups are represented. Residues selectively controlling ifenprodil inhibition (Perin-Dureau et al., 2002) are displayed with light green carbon chains and residues controlling both ifenprodil and zinc inhibition (Rachline et al., 2005) are displayed with light blue carbon chains. Residues displayed with pink carbon chains represent newly identified residues contacting ifenprodil in the model, and for which mutagenesis data were lacking. H-bonds are displayed as red dotted lines and coulombian interactions as red plain lines. At the bottom of the figure is displayed Glu236 (green), a residue that, in the model, is important for positioning Thr233 (see *Results*). Note also that Leu261 (located next to Val262), a residue selectively controlling ifenprodil inhibition and contacting ifenprodil in this model, is not represented for clarity reasons. c) Ifenprodil binding-pocket. Schematic two-dimensional view of the interactions of ifenprodil in orientation 1 with residues of NR2B NTD (same color code as in Fig. 2Ab). Van der Waals interactions are displayed as black dotted lines, H-bonds as red dotted lines and coulombian interactions as red plain lines. B, orientation 2. The representation conventions used are the same as in Fig. 2A. a) 3D model of ifenprodil binding into the NTD of NR2B in orientation 2: ring B contacts the interlobe hinge, whereas ring A is close to the entrance of the binding cleft. As in Fig. 2A, Leu261 is not displayed for clarity reasons. b) Expanded view of the binding of ifenprodil in orientation 2, showing its interactions with residues of the NTD interlobe cleft. c) The ifenprodil binding-pocket. Schematic two-dimensional view of the interactions of ifenprodil in orientation 2 with the residues of NR2B NTD.

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet

der Waals contacts with Phe176 and the carbon chain of Lys234, two residues that also selectively control ifenprodil inhibition (Rachline et al., 2005). It is noteworthy that Lys234 makes an ionic interaction with aspartates 265 and 267 (lobe II) and glutamate 47 (lobe I); accordingly, it may neutralize the electrostatic repulsion between these three residues when the domain closes.

The main differences between the two models stand in the polar interactions. Whereas the central positively charged amino group of ifenprodil, in orientation 1, makes a coulombian interaction with Asp101, in orientation 2, it interacts with another aspartate (Asp104). In these models, Asp101 and Asp104 also make a charge-dipole interaction with the linker's hydroxyl group. Mutation of Asp101 into an alanine has been shown to strongly affect ifenprodil sensitivity (Rachline et al., 2005). Model 1 accounts well for this result. However, Asp101 also has a very marked effect on zinc sensitivity (Rachline et al., 2005). This suggests that Asp101 may either be a common key residue for the coordination of both ifenprodil and zinc, or that it may play a more global structural role in the NR2B NTD. On the other hand, the mutation of Asp104 into an alanine has a relatively important effect on ifenprodil inhibition (IC_{50} 22-fold higher than for wt) and no effect on zinc inhibition, making it a potential candidate to directly bind ifenprodil (Rachline et al., 2005). This latter result is consistent with the orientation 2 model, in which Asp104 interacts with the amino group and the linker's hydroxyl group. Orientation 1, in contrast, cannot account for the selective effect of Asp104, because this residue is not pointing toward ifenprodil in the corresponding model. It is important to note, however, that the region containing these two aspartates (loop β3-α3) is very different from the corresponding loop of mGluR1, so that its modeled structure is rather uncertain. Hence, at this stage, there is still doubt concerning which residue interacts with the amino group.

Ifenprodil phenolic group (B ring with H-bond donor) interacts with completely different residues depending on its orientation in the NR2B NTD central cleft. In orientation 1 model, ifenprodil phenolic group makes hydrogen bonds with residues located at the entrance of the cleft: Thr76 and Asp77 from lobe I, and Asp206 from lobe II, thus facilitating the closure of the NTD. On the other hand, the ifenprodil phenolic group with orientation 2 makes hydrogen bonds with residues from the hinge, deep in the cleft: Gln153 and Tyr282. None of these polar residues (Thr76, Asp77, Asp206, Gln153, and Tyr282) have been mutated yet. Knowing the effect of their mutation is expected to help discriminate between the two models.

Overall, the two proposed models seem to fit satisfactorily with the previously published mutagenesis data (Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005), although doubt remains concerning the residues interacting with the amino group of ifenprodil. The good concordance between the molecular modeling results and the previously published functional data by a first assessment of the validity of the proposed models. However, the role of a few residues is still difficult to interpret, such as Glu106 and Glu236. These

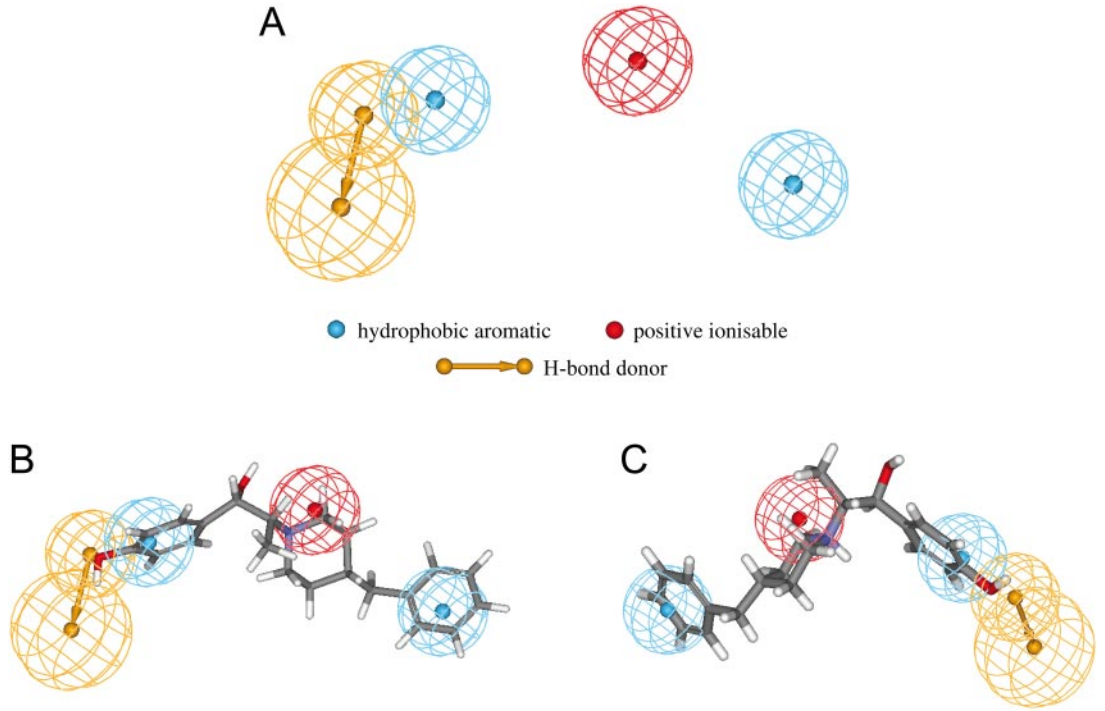


Fig. 3. The conformations adopted by ifenprodil in orientations 1 and 2 are likely to be bioactive conformations. A, pharmacophore model of ifenprodil-like antagonists binding to NR2B NTD. Pharmacophore models are 3D arrangements of electronic features, each feature representing an interaction of the ligand with its receptor. Each feature is symbolized by a central ball representing the application center of the feature in the ligand, surrounded by a tolerance sphere (light blue for hydrophobic features, red for positive ionizable, and orange for hydrogen bond donors). Because H-bonds are directional interactions, the H-bond feature is represented by two balls linked by an arrow that indicates the direction from the heavy atom to the projected point representing the position from which the hydrogen will extend. B and C, mapping of orientation 1 (B) and orientation 2 (C) ifenprodil conformations to the pharmacophore model shown in A. Ifenprodil is represented as sticks, with carbon in gray, hydrogen in white, oxygen in red, and nitrogen in dark blue. Ifenprodil in both orientations 1 and 2 closely fits the pharmacophore model (fit value of 2.34 and 2.85 over 4, respectively).

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

residues have been shown previously to selectively control ifenprodil inhibition, but they do not contact ifenprodil in both of our models. Glu106 is far from ifenprodil, pointing outside the cleft. Glu236 is buried in lobe II, but its carboxylic group is making hydrogen bonds with the Thr233 hydroxyl group, thus making the methyl group of Thr233 point toward ifenprodil (Fig. 2). Glu236 could therefore act indirectly, via Thr233, Thr233 participating in the control of ifenprodil inhibition (Perin-Dureau et al., 2002). To discriminate between the two orientations of ifenprodil and further attest to the relevance of the chosen model, we used the two complementary functional validation methods developed below.

Asp206, Tyr231 and Val262: Three New Key Residues Controlling Ifenprodil Inhibition. The two models of ifenprodil binding highlighted seven residues that could directly interact with ifenprodil (Asp206, Thr76, Asp77, Gln153, Tyr231, Val262 and Tyr282) but that had not yet been mutated (except for Val262, which had only been mutated into alanine, a rather conservative substitution). If these models are valid, the mutation of these residues with appropriate substitutions should substantially affect ifenprodil inhibition.

The mutation of Val262 into an alanine modestly affects ifenprodil sensitivity of wt NR1/NR2B receptors (Perin-Dureau et al., 2002). As previously mentioned, the lack of effect could be because alanine is still able to make a hydrophobic interaction with the ifenprodil molecule. To verify this hypothesis, we made multiple substitutions of Val262 into either hydrophobic residues of different sizes (glycine, isoleucine, and phenylalanine) or into a weakly polar (cysteine) or a charged (glutamate) residue. Typical current traces for three different mutated and wt NR1/NR2B receptors are shown in Fig. 4A. Whereas substitution of Val262 into an isoleucine slightly increases inhibition by 300 nM ifenprodil [75 ± 7% (n = 5) versus 63 ± 6% inhibition for wt (n = 9)], mutations V262F or V262D almost completely abolish inhibition by 300 nM ifenprodil [9 ± 3% inhibition each (n = 3–4)]. Ifenprodil full dose-response curves confirm that mutation of Val262 into a bulky phenylalanine or a charged acidic aspartate strongly decreases ifenprodil sensitivity (50-fold rightward shift in IC_{50}), whereas mutation into an isoleucine has an opposite effect, slightly increasing ifenprodil sensitivity (1.8-fold leftward shift in IC_{50}; Fig. 4B and Table 1). The very low ifenprodil sensitivity of NR1/NR2B-V262F is likely to be due to the bulkiness of the phenylalanine residue, thus hindering ifenprodil binding to lobe II. Likewise, in NR1/NR2B-V262D receptors, the presence of an aspartate in a hydrophobic pocket is expected to strongly disrupt ifenprodil binding to lobe II by electrostatic repulsion with the negative partial charges of the aromatic ring. In contrast, adding a supplemental methyl group, as occurs with the isoleucine mutation, may increase ifenprodil sensitivity by reinforcing hydrophobic interactions between the NTD and its ligand. We also found that mutation of Val262 into a small weakly polar residue (cysteine) induces only a modest shift in ifenprodil sensitivity (2-fold rightward shift in IC_{50}; Table 1), comparable with the shift observed with the alanine substitution. Finally, mutation of Val262 into a glycine, which removes any possible side chain interaction with ifenprodil, has a significantly larger effect on ifenprodil sensitivity, increasing ifenprodil IC_{50} 6-fold (Fig. 4B). Contrasting with these side-chain specific effects of Val262 mutations on ifenprodil sensitivity, zinc sensitivity was not, or only weakly, affected by any of the Val262 mutations. In particular, mutations NR2B-V262F and NR2B-V262D, which yield the strongest impairments of ifenprodil inhibition, had only little effect on zinc sensitivity (Fig. 4 and Table 1). The differential and selective effects of the various Val262 mutations of ifenprodil sensitivity strongly support a model in which Val262 makes a direct hydrophobic interaction with ifenprodil.

Tyrosine 231 is an additional residue potentially key for ifenprodil binding. In both orientation 1 and orientation 2 models, Tyr231 directly interacts through its aromatic ring with ifenprodil ring A (orientation 1) or B (orientation 2). The aromatic ring of Tyr231 also makes direct contact with the side chains of Phe182, Leu261, and Ile150, the two latter residues also being in direct interaction with ifenprodil. It thus seems that Tyr231 is at the center of a large hydrophobic cluster that forms part of the hydrophobic pocket where ifenprodil ring A (or B) nestles. Accordingly, mutations of Tyr231 are expected to significantly alter ifenprodil sensitivity. This is precisely what we observed. Replacing Tyr231 by a cysteine or an alanine to disrupt the interactions described above resulted in a very strong shift in ifenprodil sensitivity (~200- and ~600-fold shift in IC_{50}, respectively; Fig. 5 and Table 1). These effects are larger than for any other single point mutant studied so far. In fact, the sensitivity of NR1/NR2B-Y231A receptors to ifenprodil is very close to the one of NR1/NR2B-ΔNTD receptors (receptors deleted for the entire NR2B NTD), demonstrating that substituting Tyr231 by an alanine completely disrupts the ifenprodil binding site. In contrast, zinc sensitivity is only weakly affected by the A (or C) mutation (~2-fold shift in IC_{50}; Fig. 5), excluding the possibility that Tyr231 mutations exert their effects through an indirect global structure disruption.

We also assessed the proton sensitivity of receptors containing mutations at Val262 and Tyr231. Indeed, protons are potent inhibitors of NR1/NR2B receptors (H^+ IC_{50} of pH ~7.3 close to the physiological pH), and ifenprodil has been proposed to inhibit receptor activity through an enhancement of tonic proton inhibition (Mott et al., 1998). It could therefore be that the reduced ifenprodil inhibition that we observed on the mutant receptors reflects a decrease in pH sensitivity. To verify whether this is the case, we determined the pH sensitivity of the mutant receptors that yield the strongest decrease in ifenprodil sensitivity [i.e., NR1/NR2B-V262F and NR1/NR2B-Y231A (≥50-fold shift in ifenprodil IC_{50}; Table 1)]. We also determined pH sensitivity of receptors containing either NR2B-D101A or NR2B-F176A, two mutations that we previously showed to strongly affect ifenprodil sensitivity (Perin-Dureau et al., 2002). As shown in Figure S1, none of these mutations have a significant effect on pH sensitivity [pH IC_{50} of 7.52 (n = 4), 7.46 (n = 4), 7.50 (n = 4), and 7.39 (n = 3) for NR1/NR2B-D101A, NR1/NR2B-F176A, NR1/NR2B-Y231A, and NR1/NR2B-V262F receptors, respectively, versus 7.45 (n = 4) for wt NR1/NR2B receptors]. These data demonstrate that the mutations do not alter ifenprodil sensitivity secondary to changes in pH sensitivity. Rather, they provide further validation that the identified residues are likely to be true binding residues and do not act through indirect gating effects.

Because in the two proposed models, both Val262 and Tyr231 make hydrophobic interactions with the aromatic rings of ifenprodil (ring A in orientation 1 or ring B in orien-

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

tation 2), the above results are of little help to discriminate between orientations 1 and 2. The situation is strikingly different concerning the interactions of the hydroxyl group of ring B. In orientation 2, the ifenprodil phenol moiety is proposed to make hydrogen bonds with two residues from the hinge, Gln153 and Tyr282. The mutation of Gln153 into an alanine or a cysteine, to prevent formation of these hydrogen bonds, results in only a very mild shift in ifenprodil sensitivity (1.5- to 2-fold shift in IC_{50}; Table 1 and Figure S2A). Likewise, the mutation of Tyr282 into a cysteine, a serine, or a tryptophan induces a modest, but stronger, decrease in ifenprodil sensitivity (~4-fold shift in IC_{50}; Figure S2C). As the presence of a H-bond donor at the para position of ring B is critical for ifenprodil-like compounds activity (Chenard and Menniti, 1999), and as in orientation 2, ifenprodil phenolic group is in a rather hydrophobic environment, the mutations of either Gln153 or Tyr282 would, in orientation 2, be expected to induce relatively strong effects on ifenprodil sensitivity. This is clearly not what we observed, indicating that the model of ifenprodil binding in orientation 2 is likely to be incorrect. It is noteworthy that the mutations of residues Gln153 or Tyr282 induce a decrease in the maximal level of inhibition produced by ifenprodil (Supplemental Fig. S2, A and C). The larger effect is obtained with the Y282S mutation, which yields a maximal inhibition of 66% (versus 95% on wt NR1/NR2B receptors; Supplemental Fig. S2C). However, because zinc inhibition is not affected by these hinge mutations (Supplemental Fig. S2, B and D), it is likely that

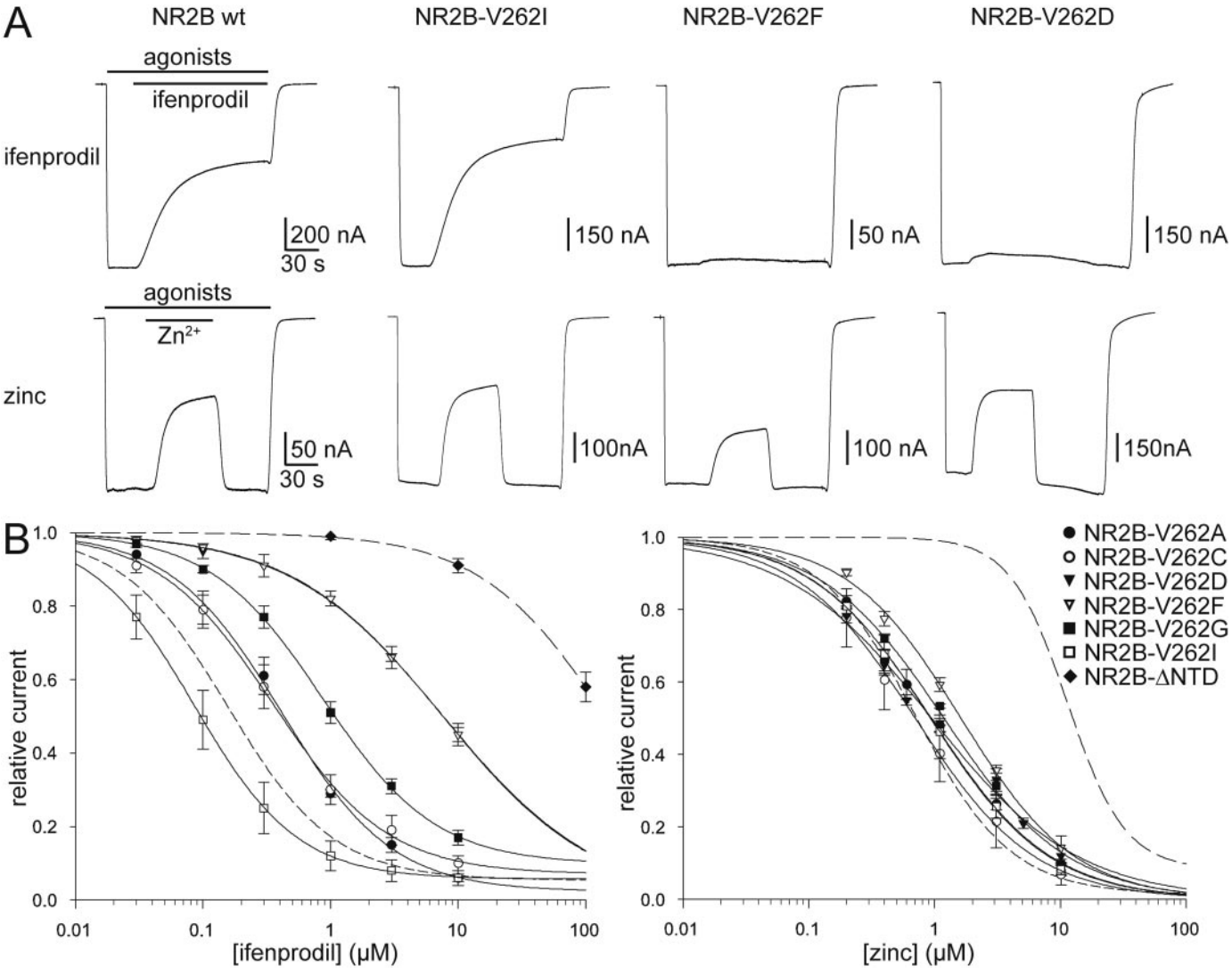


Fig. 4. NR2B-Val262, a new key residue selectively controlling ifenprodil inhibition. A, typical current traces obtained from oocytes coexpressing the wt NR1 subunit with wt or mutated Val262I, V262F, or V262D NR2B subunits. Ifenprodil was applied at a concentration of 300 nM and zinc at 1 μM, each during an application of agonists. The bars above the current traces indicate the duration of agonists, ifenprodil, and zinc applications. Note that the inhibition produced by 1 μM zinc is only weakly affected by any of the three mutations [inhibition of 54 ± 8% (n = 3), 41 ± 2% (n = 4), and 51 ± 2% (n = 3) for NR2B-Val262I, V262F, and V262D mutations, respectively, versus 61 ± 4% for wt receptors (n = 12)]. In contrast, ifenprodil sensitivity is strongly reduced by the NR2B-V262F or D mutations, whereas it is slightly increased with the NR2B-Val262I mutation. B, ifenprodil (left) and zinc (right) concentration-response curves of NR1/NR2B receptors containing different substitutions at the NR2B-Val262 position. The dashed curves are the fits of the ifenprodil or zinc dose-response curves of wt NR1/NR2B receptors (short dashes) and receptors truncated for their entire NR2B-NTD (NR1/NR2B-ΔNTD, long dashes; see Rachline et al., 2005). Experimental data points obtained with NR1/NR2B-ΔNTD receptors are displayed as closed diamonds. Each data point is the mean value of at least three different cells. The estimated values of IC_{50} are listed in Table 1. Note that NR2B-Val262 mutations selectively and differentially affect ifenprodil sensitivity. Note also that the experimental data points and the fits of the NR1/NR2B-V262D (▲) and NR1/NR2B-V262F (△) mutant receptor dose-response curves overlap.

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

these do not modify the intrinsic gating properties of the receptor but rather the binding of ifenprodil per se. The mechanism underlying the partial nature of NR1/NR2B receptor inhibition by ifenprodil-like compounds is still unknown, but it is conceivable that, in these modified NR2B NTDs, ifenprodil adopts a slightly different position resulting in a decreased level of inhibition of the receptors.

To test the validity of the ifenprodil binding model with

TABLE 1
Effects on ifenprodil and zinc sensitivity of various mutations in NR2B NTD

NR2B Mutants	Ifenprodil			Zinc		
	IC_{50}	Mutant/wt Ratio	*n*	IC_{50}	Mutant/wt Ratio	*n*
	μM			*μM*		
wt	0.16 ± 0.01		9	0.70 ± 0.08		15
T76						
T76A	2.3 ± 0.8	15	3	0.60 ± 0.06	0.8	6
T76C	2.5 ± 0.1	16	3	0.9 ± 0.1	1.3	3
T76S	0.43 ± 0.01	2.8	3	0.40 ± 0.05	0.6	3
D77						
D77C	2.8 ± 0.2	18	4	0.9 ± 0.3	1.3	5
Q153						
Q153A	0.22 ± 0.04	1.4	7	0.8 ± 0.3	1.1	4
Q153C	0.28 ± 0.02	1.8	7	0.8 ± 0.3	1.1	6
D206						
D206A	4 ± 1	30	7	2.6 ± 0.4	3.7	6
D206C	5 ± 2	30	4	1.4 ± 0.1	2.0	5
D206E	1.5 ± 0.1	10	8	0.74 ± 0.02	1.1	6
D206F	7 ± 4	45	3	2.0 ± 0.1	2.9	3
D206K	13 ± 15	80	3	4.7 ± 0.2	6.7	3
Y231						
Y231A	53 ± 10	350	3	1.6 ± 0.4	2.3	3
Y231C	26 ± 8	170	6	1.6 ± 0.6	2.3	6
V262						
V262A	0.41 ± 0.04	2.6	3	0.9 ± 0.1	1.3	3
V262C	0.35 ± 0.03	2	3	0.7 ± 0.1	1.0	4
V262D	8 ± 2	50	4	0.9 ± 0.1	1.3	3
V262F	8 ± 2	50	3	1.6 ± 0.3	2.3	4
V262G	0.87 ± 0.04	5.6	5	1.2 ± 0.3	1.7	3
V262I	0.09 ± 0.001	0.55	5	0.9 ± 0.1	1.3	3
Y282						
Y282C	0.8 ± 0.2	5	9	0.7 ± 0.1	1	7
Y282S	0.7 ± 0.1	4.5	3	1.6 ± 0.6	2.3	3
Y282W	0.24 ± 0.02	1.5	4	0.9 ± 0.1	1.3	3
NTD deletion						
NR2B-ΔNTD	145 ± 3	900	3	11 ± 1	16	3

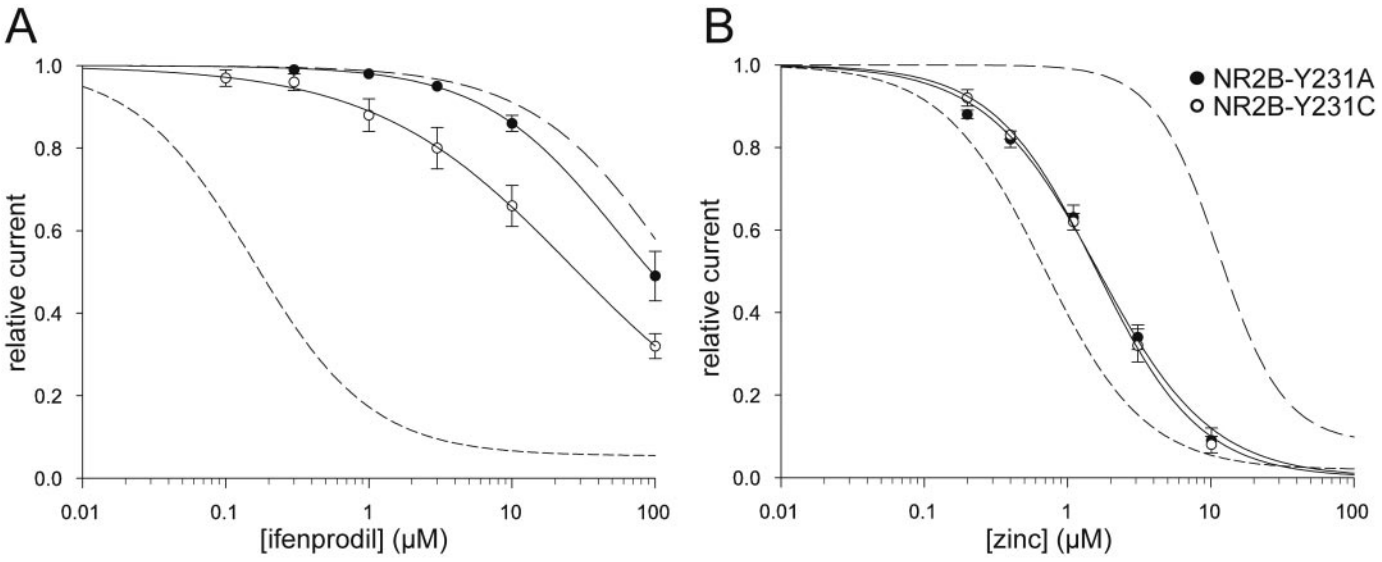


Fig. 5. NR2B-Tyr231, an additional key residue controlling ifenprodil inhibition. Ifenprodil and zinc sensitivity of NR1/NR2B receptors substituted with different residues at the NR2B-Tyr231 position. In each panel, the dashed curves are the fits of the ifenprodil or zinc dose-response curves of wt NR1/NR2B receptors (short dashes) and NR1/NR2B-ΔNTD receptors (long dashes). Each data point is the mean value of at least three different oocytes. A, ifenprodil concentration-response curves B, zinc concentration-response curves. The estimated values of IC_{50} are listed in Table 1. Note that the shift in ifenprodil sensitivity produced by the NR2B-Y231A mutation is almost as large as the shift produced by the deletion of the entire NR2B NTD.

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

orientation 1, the three residues that make hydrogen bonds with the phenol moiety in this orientation, Thr76, Asp77 and Asp206, were mutated. To verify that Asp206 actually acts as a H-bond acceptor, its polarity was either conserved (glutamate mutation) or changed by introducing hydrophobic (alanine and phenylalanine), neutral polar (cysteine) or positively charged (lysine) residues. Figure 6, A and B, shows that such mutations of Asp206 affect both ifenprodil and zinc sensitivity but, depending on the substitution, the amplitude of the effects differs significantly between the two ligands. For zinc sensitivity, we observed a strong correlation with the side chain charge. First, mutating the aspartate into a glutamate (charge conservation) has no effect on zinc sensitivity [IC_{50} of 0.67 μM for NR2B-D206E (n = 3) versus 0.70 μM for wt receptors (n = 15); Fig. 6B]. Second, the mutant receptors become progressively less sensitive to zinc as the charge of the substituting amino acid becomes more positive (Glu → Cys, Ala, Phe → Lys; Fig. 6B and Table 1). It is noteworthy that the mutations of the homologous NR2A residue Asp207 had the same phenotype on high-affinity zinc sensitivity of NR1/NR2A receptors (Paoletti et al., 2000). NR2A-Asp207, located at the entrance of the NTD cleft, was then proposed to provide a favorable electrostatic environment for zinc to access the cleft. Therefore, we propose that, concerning zinc sensitivity, Asp206 in NR2B may have a similar attractive role. In contrast to the effects seen on zinc sensitivity, we observed that ifenprodil sensitivity is greatly reduced by mutations at Asp206, whatever the nature of the mutation (Fig. 6A). In particular, substitution of Asp206 by a glutamate, a residue that is still capable of forming H-bonds but is one carbon longer, induces a 10-fold decrease in ifenprodil sensitivity (Table 1). Mutation of Asp206 into a weakly

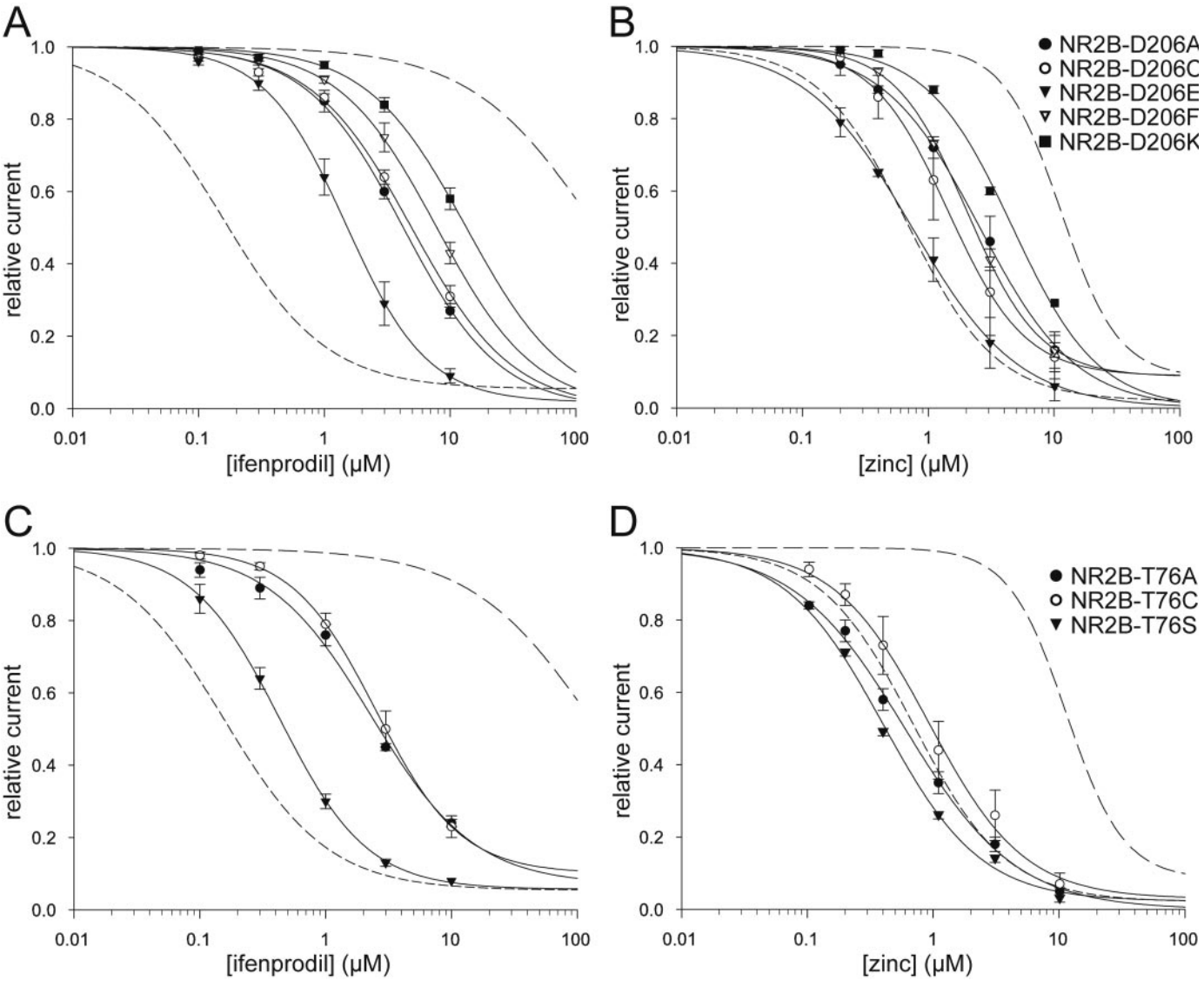


Fig. 6. Effects of NR2B-Asp206 and NR2B-Thr76 mutations on ifenprodil and zinc sensitivity. Ifenprodil and zinc sensitivity of NR1/NR2B receptors substituted with different residues at NR2B-Asp206 and NR2B-Thr76 positions. In each panel, the dashed curves are the fits of the ifenprodil or zinc dose-response curves of wt NR1/NR2B receptors (short dashes) and NR1/NR2B-ΔNTD receptors (long dashes). Each data point is the mean value of at least three different oocytes. A, ifenprodil concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Asp206 position. B, zinc concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Asp206 position. C, ifenprodil concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Thr76 position. D, zinc concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Thr76 position. The estimated values of IC_{50} are listed in Table 1.

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

MOL PHARM

MOLECULAR PHARMACOLOGY

polar (cysteine) or hydrophobic residue (alanine, phenylalanine) produces a much larger decrease in ifenprodil sensitivity (30–45-fold shift in IC_{50}; Table 1 and Fig. 6A). The largest effect is obtained by the mutation of Asp206 into a lysine (80-fold shift in IC_{50}), a bulky and positively charged residue. These results strongly suggest that, in addition to its attractive electrostatic role, Asp206 is also likely to directly contact the ifenprodil molecule through polar bonds. This result clearly favors orientation 1 model, in which Asp206 makes a charge-dipole interaction with ifenprodil B-ring hydroxyl group.

The mutation of Asp77 into a cysteine selectively reduces ifenprodil sensitivity (IC_{50} 18-fold higher than for wt receptors), with no change in zinc sensitivity (Supplemental Fig. S3 and Table 1). Besides, the mutation of Thr76 into an alanine or a cysteine has a similar phenotype (15-fold shift in ifenprodil IC_{50}; very little change in zinc IC_{50}; Fig. 6, C and D, and Table 1). These results suggest that Thr76 and Asp77 are likely to interact with ifenprodil. Moreover, mutating Thr76 into a serine, a residue with a conserved alcohol function, but without the methyl group of threonine, only slightly affects ifenprodil sensitivity [<3-fold shift in ifenprodil IC_{50}; Fig. 6C and Table 1], indicating that the alcohol function of the threonine is an important determinant of ifenprodil sensitivity. Thus, Thr76, through its hydroxyl moiety, is likely to make a hydrogen bond with ifenprodil. Altogether these results show that Asp206, Thr76, and Asp77 control ifenprodil inhibition, whereas Gln153 and Tyr282 do not. These results are fully consistent with ifenprodil binding in the NTD of NR2B in orientation 1.

Orienting Ifenprodil in Its Binding-Pocket Using the Cysteine Affinity Labeling Approach. If site-directed mutagenesis experiments can provide reliable information regarding which residues control sensitivity to a ligand, they are less powerful to discriminate between residues actually directly binding the ligand from residues having more distant structural effects. In our case, the presence of a second ligand of very different chemical nature, the zinc ion, which also binds into NR2B NTD (Rachline et al., 2005), enables us to distinguish residues selectively controlling ifenprodil inhibition (considered truly "binding" residues) from residues controlling both ifenprodil and zinc inhibition (considered potential "structural" residues). However, for ifenprodil-selective residues, an uncertainty remains whether they are directly in contact with ifenprodil or they belong to its second coordination sphere. Furthermore, site-directed mutagenesis experiments give no direct information about the precise part of the ligand interacting with the highlighted residue. To probe for direct interactions between a precise region of the NTD and a specific part of the ifenprodil molecule, and thus help orientate unequivocally this compound into its binding pocket, we used the cysteine affinity labeling approach (Foucaud et al., 2001). This technique involves the formation of a covalent bond between a cysteine-reactive ligand derivative and a cysteine-substituted receptor, provided that the ligand reactive group and the cysteine are in close proximity (Fig. 7A) (Foucaud et al., 2001). This strategy was previously applied to explore the glycine-binding site of the NMDAR NR1 subunit (Foucaud et al., 2003), and the results were remarkably consistent with the crystal structure of the NR1 agonist-binding domain (Furukawa and Gouaux, 2003). In our case, we used the reactive ifenprodil derivatives previously developed by Alarcon et al. (2008) and particularly *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide, in which the phenolic hydroxyl group was replaced by a cysteine-reactive chloroacetamide group (Fig. 7). *N*-{4-[2-(4-Benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide displays the required reactivity toward cysteine, good stability in solution and significant NR2B NTD-mediated antagonist properties at wt NR1/NR2B receptors (IC_{50} of 14 μM; Alarcon et al., 2008). Furthermore, the two point mutations, NR2B-D101A and V262D, that strongly decrease ifenprodil sensitivity (see Table 1), also markedly reduced sensitivity of NR1/NR2B receptors for *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide [inhibition by 10, 30 and 100 μM of 8 ± 2, 15 ± 7, and 20 ± 3%, respectively, for NR1wt/NR2B-D101A receptors (n = 3), of 12 ± 8, 17 ± 5, and 28 ± 9%, respectively, for NR1wt/NR2B-V262D receptors (n = 3) versus 41 ± 14, 56 ± 11, and 81 ± 6%, respectively, for wt NR1/NR2B receptors (n = 5)], indicating that *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide is likely to share the same anchoring points as ifenprodil in the NR2B NTD cleft.

To test which of the orientations (orientation 1 or 2) is used by *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide, we substituted residues Thr76, Leu205, Asp206, Gln153 and Val262 of the NR2B NTD by cysteines. We selected these residues because there are predicted to contact [or be in close vicinity to (Leu205)] the reactive antagonist in the different docking orientations (Fig. 2). The initial NMDA current (I_0) was measured on oocytes expressing NMDARs containing one of the above cysteine mutations. Oocytes were then incubated in a solution containing a high concentration of *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide (500 μM, close to saturation), and after 30 min of incubation, they were washed to remove any reversible binding of *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide. After washing, the NMDA current was measured again (I_{incub}). We expected the ratio I_{incub}/I_0 to be less than 1 if *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide induced an irreversible labeling of the cysteine-modified receptors and to be close to 1 if no irreversible labeling occurred. We were surprised to find, however, that in preliminary control experiments, long incubation times with *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide, even with the nonreactive ifenprodil molecule, could produce a long-lasting inhibition of wt NR1/NR2B receptors, an effect that is mediated by the binding of the ligand to the NR2B NTD (see *Materials and Methods*). To circumvent this undesired "side" effect, we systematically compared the effects of the reactive ligand on cysteine-substituted NMDARs with those on NMDARs substituted with an alanine at the same position. As an additional control, we checked that, at the positions tested, receptors mutated into an alanine or a cysteine had similar ifenprodil IC_{50} values. This was indeed the case (Table 1). With these precautions in hand, a significant difference between the I_{incub}/I_0 ratios of alanine- and cysteine-substituted receptors is expected to account for an irreversible labeling of the targeted position. As shown in Fig. 7B, at positions lining the entrance of the NR2B NTD cleft (i.e., Leu205 and Asp206 from lobe II and Thr76 from lobe I), a significant difference is observed between the I_{incub}/I_0 ratio of the alanine and the

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

cysteine mutant. This result suggests that *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide could specifically react with the NTD at these positions. On the contrary, no significant difference is observed at positions Gln153 and Val262, close to the hinge. These results are strongly in favor of the orientation 1 docking model in which ifenprodil phenol group is near the entrance of the binding cleft, whereas its phenyl group points in the opposite direction toward the hinge. These results also provide further support toward a direct interaction of the residues Thr76 and Asp206 with the phenolic hydroxyl group of ifenprodil, as proposed in the orientation 1 model.

Discussion

In the present work, we delineate the structural determinants that are responsible for the high-affinity binding of ifenprodil on the NR2B subunit. For that purpose, we have built 3D homology models of ifenprodil docked in its binding pocket and have subjected these models to an extensive experimental validation process based on site-directed mutagenesis and cysteine affinity labeling. A number of important features emerge from this study: first, as evidenced by the stable docking, ifenprodil fits well into the central crevice of the NR2B N-terminal domain modeled according to a

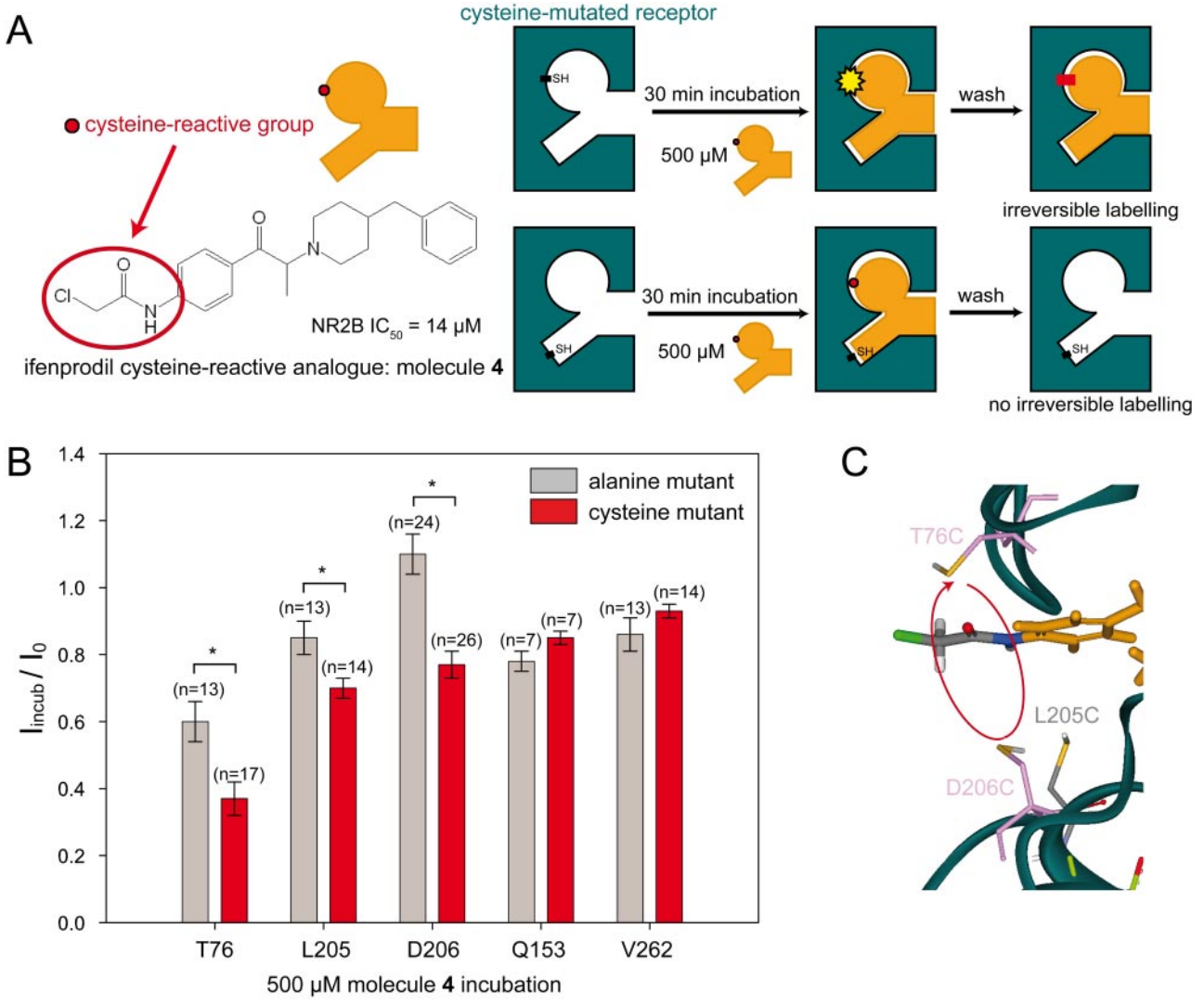


Fig. 7. Orienting ifenprodil in its binding pocket using cysteine affinity labeling. A, principle of the cysteine affinity labeling approach. This technique is based on the formation of a covalent bound between a cysteine-reactive ligand (schematized in orange with a red circle representing the cysteine-reactive group) and a cysteine-modified receptor (schematized in green). If the cysteine and the cysteine-reactive group are in close proximity, the formation of a covalent bound leads to an irreversible labeling of the receptor (in our case an irreversible inhibition). In the present work, we used *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide, a cysteine-reactive ifenprodil analog containing a cysteine-reactive chloroacetamide group on the *para*-position of the B-ring (circled in red). B, affinity labeling results. For each position, the I_{incub}/I_0 ratio of the cysteine mutant is represented as a red bar and that of the corresponding alanine mutant as a gray bar. Error bars represent the standard error of the mean. The numbers of oocytes used for each construction are shown in parentheses above the bars. We used a Student *t* test to probe for a significant difference between the I_{incub}/I_0 ratios of the alanine and the cysteine substitution at the same position (*, $P < 0.05$). C, representation of *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide (orange sticks) bound to the NR2B NTD in orientation 1, with cysteine residues at positions NR2B-Thr76, Asp206 (pink carbon chains) and Leu205 (gray carbon chain) introduced by in silico mutagenesis. Sulfur atoms are displayed in yellow and hydrogen atoms in white. Hydrogen atoms of the cysteine carbon chains are not represented. The chloroacetamide group (displayed as sticks colored as follows: carbon in gray, chloride in green, hydrogen in white, nitrogen in dark blue, and oxygen in red) displays rotational mobility (red curved arrow) and thus can potentially make covalent bonds with either lobe I (T76C) or lobe II (D206C and L205C) residues.

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

MOL PHARM

MOLECULAR PHARMACOLOGY

closed conformation of the structurally related bilobate agonist-binding domain of mGluR1. Second, despite being a rather symmetrical molecule, ifenprodil likely adopts an unique and well-defined orientation within this crevice. Third, ifenprodil seems to interact with residues of both NTD lobes, strongly suggesting that it stabilizes a closed-cleft conformation of NR2B NTD, much like activating ligands at other LIVBP-like Venus-flytrap domains (Kunishima et al., 2000; Magnusson et al., 2004; Acher and Bertrand, 2005). Fourth, high-affinity ifenprodil binding is achieved through multiple ligand-protein interactions, involving electrostatic and hydrogen bonds together with Van der Waals contacts distributed all along the ifenprodil molecule.

Based on our models, we have identified, in site-directed mutagenesis experiments, five new NR2B NTD residues that are key for high-affinity ifenprodil inhibition of NR1/NR2B receptors: Thr76, Asp77, Asp206, Tyr231, and Val262. Moreover, by performing multiple side-chain substitutions at these positions and by systematically controlling for specificity toward ifenprodil versus zinc, the other known NR2B NTD ligand (Rachline et al., 2005), we obtained strong support for direct interaction between these residues and ifenprodil. This conclusion was strengthened further in the case of NR2B residues Asp101, Phe176, Tyr231, and Val262 by showing that mutations at these positions that strongly affect ifenprodil sensitivity (up to >300-fold shift in ifenprodil IC_{50}, the case of the NR2B-Y231A mutation) do not alter pH sensitivity. All together, these mutagenesis results provide a clear experimental validation of our proposed models. They also allowed us to propose an orientation of the ifenprodil molecule in its binding pocket, something that the modeling alone could not achieve. Ifenprodil binds in an extended conformation, almost perpendicular to the plane of the NTD hinge with its phenyl group (ring A) located close to the NTD hinge and its phenol moiety (ring B) pointing toward the entrance of the cleft. We obtained an additional confirmation that this orientation is likely to be functionally relevant by performing cysteine affinity labeling experiments. Indeed, experiments using *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide, a thio-reactive ifenprodil analog functionalized at the level of the phenol hydroxyl group, revealed that this compound can react with cysteines introduced at the entrance of the NTD cleft but not with cysteines deep in the cleft near the hinge. Moreover, the fact that *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide labels residues from both lobes of the NTD (Thr76 from lobe I and Leu205 and Asp206 from lobe II) strongly supports a model in which binding of ifenprodil promotes closure of NR2B NTD.

However, if mutagenesis experiments gave effects on ifenprodil inhibition easily interpretable, cysteine affinity labeling experiments were harder to settle. First, although applied at a concentration close to saturation, *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide induced only a partial irreversible labeling of the cysteine-mutated receptors as judged by the changes in current amplitude (specific inhibition from 18% for the L205C mutation to 38% for the T76C mutation; Fig. 7). The partial nature of the irreversible labeling may be due to the low reactivity of *N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide with free cysteines in solution ($t_{1/2}$ = 114 min in an excess of *N*-acetylcysteine methyl-ester; Alarcon et al., 2008), although (*N*-{4-[2-(4-benzyl-piperidin-1-yl)-propionyl]-phenyl}-2-chloro-acetamide is expected to react much faster once bound in NR2B NTD because of presumably close proximity of the thiol reactive group with the introduced cysteines. We also attempted affinity labeling experiments with another cysteine-reactive ifenprodil analog: compound **12** from Alarcon et al. (2008), containing an isothiocyanate group at the para position in ring A. If ifenprodil does actually bind in NR2B NTD with orientation 1, compound **12** was expected to specifically label cysteines introduced at positions close to the hinge. We were disappointed, however, that we could not find any position in NR2B NTD at which irreversible labeling with this molecule could be observed, either at positions close to the hinge or at positions close to the entrance of the cleft. Assuming our model is valid, this lack of effect could be due to strong structural constraints: from one side, the low intrinsic rotational mobility of the isothiocyanate group, and from the other, the narrowness of the binding pocket near the NTD hinge. These two effects combined may sharply decrease the probability to find a position at which a cysteine could be properly orientated to react with molecule **12** isothiocyanate group.

A model of ifenprodil binding in NR2B NTD, with no experimental validation, was already proposed by Marinelli et al (2007). Our model shares only few similarities with theirs, in which ifenprodil has an almost perpendicular orientation. This difference of docking orientation could be explained by the use of a different sequence alignment, especially for some loops located in the binding cleft. which could give rise to a different shape of ifenprodil binding-site. Marinelli et al. (2007) found, as we did, an interaction of Asp101 with both the central positive amino group and the linker's hydroxyl group. They also highlight Val262 as a residue near the ifenprodil molecule. However, in their case, Val262 interacts with the phenol moiety (ring B), whereas in ours it interacts with the other aromatic ring, the phenyl moiety (ring A). There are multiple points in the model of Marinelli et al. (2007) that are difficult to reconcile with experimental results obtained in this and previous studies. For instance, their model does not explain the critical roles of Ile150 and the newly found Tyr231 residue, two residues that produce the largest observed shifts in ifenprodil sensitivity when mutated into alanine with no or little effect on zinc sensitivity (Perin-Dureau et al., 2002 and this study). Furthermore, ifenprodil phenol hydroxyl group is proposed to be in close proximity with Asp265. An alanine mutation of this residue, located in a rather apolar environment, should therefore have a substantial effect on ifenprodil sensitivity. However, such mutation has no effect on ifenprodil sensitivity (Perin-Dureau et al., 2002). These data obviously do not substantiate the model obtained by Marinelli et al. (2007).

An interesting and striking observation is that almost all the residues that in our model line the ifenprodil binding pocket by directly interacting with the ligand are conserved in NR2A NTD (but not in NR2C or NR2D NTD). Of 13 contacting residues, 11 are identical between the two subunits, one is homologous (Thr233, which is a serine in NR2A), and one is absent (Val42, which is a glycine in NR2A) (Fig. 1). The question arises then of why ifenprodil does not affect activity of NR1/NR2A receptors by binding to NR2A NTD as the zinc ion does. A single residue could make the difference. For instance, it is conceivable that ifenprodil cannot enter the NR2A NTD crevice because of steric hindrance produced by a

aspet

Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

bulky NR2A-specific residue protruding in the crevice. A potential candidate residue is NR2A-H42, which is replaced by a serine in NR2B. However, substituting this histidine into a shorter alanine does not confer ifenprodil sensitivity (L. Mony and P. Paoletti, unpublished observations). The most divergent region between NR2A and NR2B NTD is the β1-α1 region, which includes NR2B-V42. Again, replacing this entire region of NR2A-NTD with that of NR2B fails to confer ifenprodil sensitivity to the modified NR1/NR2A receptor (L. Mony and P. Paoletti, unpublished observations). Functional studies using NTD chimeric NR2 subunits and binding studies on the isolated NR2B NTD (Perin-Dureau et al., 2002; Wong et al., 2005) indicate that the molecular determinants underlying high-affinity ifenprodil binding are fully embedded in the NR2B NTD with no contribution from NR2B-specific residues outside this domain. It is possible therefore that ifenprodil selectivity for NR2B NTD originates from a limited number of NR2B-specific residues scattered throughout the NTD sequence and that are key for correct positioning of residues directly interacting with the ifenprodil molecule.

Acknowledgments

We thank Sanofi-Synthélabo for the gift of ifenprodil.

References

Acher FC and Bertrand HO (2005) Amino acid recognition by venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers* **80:**357–366.
Alarcon K, Martz A, Mony L, Neyton J, Paoletti P, Goeldner M, and Foucaud B (2008) Reactive derivatives for affinity labeling in the ifenprodil site of NMDA receptors. *Bioorg Med Chem Lett* **18:**2765–2770.
Avenet P, Léonardon J, Besnard F, Graham D, Frost J, Depoortere H, Langer SZ, and Scatton B (1996) Antagonist properties of the stereoisomers of ifenprodil at NR1A/NR2A and NR1A/NR2B subtypes of the NMDA receptor expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* **296:**209–213.
Barnum D, Greene J, Smellie A, and Sprague P (1996) Identification of common functional configurations among molecules. *J Chem Inf Comput Sci* **36:**563–571.
Bertrand HO, Bessis AS, Pin JP, and Acher FC (2002) Common and selective molecular determinants involved in metabotopic glutamate receptor agonist activity. *J Med Chem* **45:**3171–3183.
Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson DJ, States DJ, Swaminathan S, and Karplus M (1983) CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comput Chem* **4:**187–217.
Chazot PL (2004) The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem* **11:**389–396.
Chenard BL and Menniti FS (1999) Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des* **5:**381–404.
Chizh BA, Headley PM, and Tzschentke TM (2001) NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci* **22:**636–642.
Choi YB and Lipton SA (1999) Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn^{2+} inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23:**171–180.
Cull-Candy SG, and Leszkiewicz DN (2004) Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **255:**1–9.
Dingledine R, Borges K, Bowie D, and Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51:**7–61.
Foucaud B, Laube B, Schemm R, Kreimeyer A, Goeldner M, and Betz H (2003) Structural model of the *N*-methyl-D-aspartate receptor glycine site probed by site-directed chemical coupling. *J Biol Chem* **278:**24011–24017.
Foucaud B, Perret P, Grutter T, and Goeldner M (2001) Cysteine mutants as chemical sensors for ligand-receptor interactions. *Trends Pharmacol Sci* **22:**170–173.
Furukawa H and Gouaux E (2003) Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J* **22:**2873–2885.
Gallagher MJ, Huang H, Pritchett DB, and Lynch DR (1996) Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the *N*-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **271:**9603–9611.
Gielen M, Le Goff A, Stroebel D, Johnson JW, Neyton J, and Paoletti P (2008) Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57:**80–93.
Gogas KR (2006) Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* **6:**68–74.
Hatton CJ and Paoletti P (2005) Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* **46:**261–274.
Kemp JA and McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* **5:**1039–1042.
Kew JN and Kemp JA (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **179:**4–29.
Kunishima N, Shimada Y, Tsuji Y, Sato T, Yamamoto M, Kumasaka T, Nakanishi S, Jingami H, and Morikawa K (2000) Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407:**971–977.
Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, and Traynelis SF (2000) Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of *N*-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97:**11062–11067.
Magnusson U, Salopek-Sondi B, Luck LA, and Mowbray SL (2004) X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity. *J Biol Chem* **279:**8747–8752.
Malherbe P, Mutel V, Broger C, Perin-Dureau F, Kemp JA, Neyton J, Paoletti P, and Kew JNC (2003) Identification of critical residues in the amino terminal domain of the human NR2B subunit involved in the RO 25–6981 binding pocket. *J Pharmacol Exp Ther* **307:**897–905.
Marinelli L, Cosconati S, Steinbrecher T, Limongelli V, Bertamino A, Novellino E, and Case DA (2007) Homology modeling of NR2B modulatory domain of NMDA receptor and analysis of ifenprodil binding. *ChemMedChem* **2:**1498–1510.
Masuko T, Kashiwagi K, Kuno T, Nguyen ND, Pahk AJ, Fukuchi J, Igarashi K, and Williams K (1999) A regulatory domain (R1–R2) in the amino terminus of the *N*-methyl-D-aspartate receptor: Effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol* **55:**957–969.
Mayer ML (2006) Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440:**456–462.
Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P, Traynelis SF, and Dingledine R (1998) Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* **1:**659–667.
Nikam SS and Meltzer LT (2002) NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Curr Pharm Des* **8:**845–855.
Paoletti P, Ascher P, and Neyton J (1997) High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17:**5711–5725.
Paoletti P and Neyton J (2007) NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **7:**39–47.
Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Le Goff A, Callebaut I, and Neyton J (2000) Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28:**911–925.
Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, and Paoletti P (2002) Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22:**5955–5965.
Rachline J, Perin-Dureau F, Le Goff A, Neyton J, and Paoletti P (2005) The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* **25:**308–317.
Rost B and Sander C (1993) Prediction of protein secondary structure at better than 70% accuracy. *J Mol Biol* **232:**584–599.
Tamiz AP, Whittemore ER, Zhou ZL, Huang JC, Drewe JA, Chen JC, Cai SX, Weber E, Woodward RM, and Keana JF (1998) Structure-activity relationships for a series of bis(phenylalkyl)amines: potent subtype-selective inhibitors of *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J Med Chem* **41:**3499–3506.
Venkatachalam CM, Jiang X, Oldfield T, and Waldman M (2003) LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. *J Mol Graph Model* **21:**289–307.
Williams K (1993) Ifenprodil discriminates subtypes of the *N*-methyl-D-aspartate receptor-selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* **44:**851–859.
Wong E, Ng FM, Yu CY, Lim P, Lim LH, Traynelis SF, and Low CM (2005) Expression and characterization of soluble amino-terminal domain of NR2B subunit of *N*-methyl-D-aspartate receptor. *Protein Sci* **14:**2275–2283.

Address correspondence to: Dr. Pierre Paoletti, Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. E-mail: paoletti@biologie.ens.fr

MOL PHARM
MOLECULAR PHARMACOLOGY
aspet
Downloaded from molpharm.aspetjournals.org at CNRS/INIST on December 22, 2008

Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by NMDA receptors

Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Léonetti, Anne Le Goff, Karin Alarcon, Jacques Neyton, Hugues-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti

10.1124/mol.108.050971

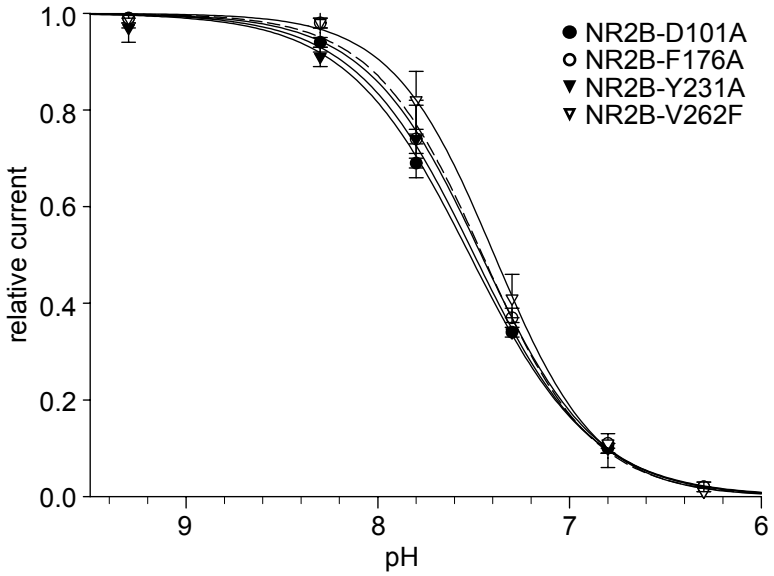


Figure S1

Figure S1: The strong ifenprodil mutations NR2B-D101A, -F176A, -Y231A and -V262F do not alter pH sensitivity.

pH dose-response curves of four mutated NR1/NR2B receptors with strongly decreased ifenprodil sensitivities (≥ 50-fold shift in ifenprodil IC_{50}; see Table 1 and Perin-Dureau et al., 2002). The dashed curve is the fit of the pH dose-response curve of wt NR1/NR2B receptors (pH IC_{50} of 7.45, n = 4). The pH IC_{50} values of the mutated receptors are: 7.52 (n = 4) for NR2B-D101A, 7.46 (n = 4) for NR2B-F176A, 7.50 (n = 4) for NR2B-Y231A and 7.39 (n = 3) for NR2B-V262F.

Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by NMDA receptors
Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Léonetti, Anne Le Goff, Karin Alarcon, Jacques Neyton, Hugues-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti
10.1124/mol.108.050971

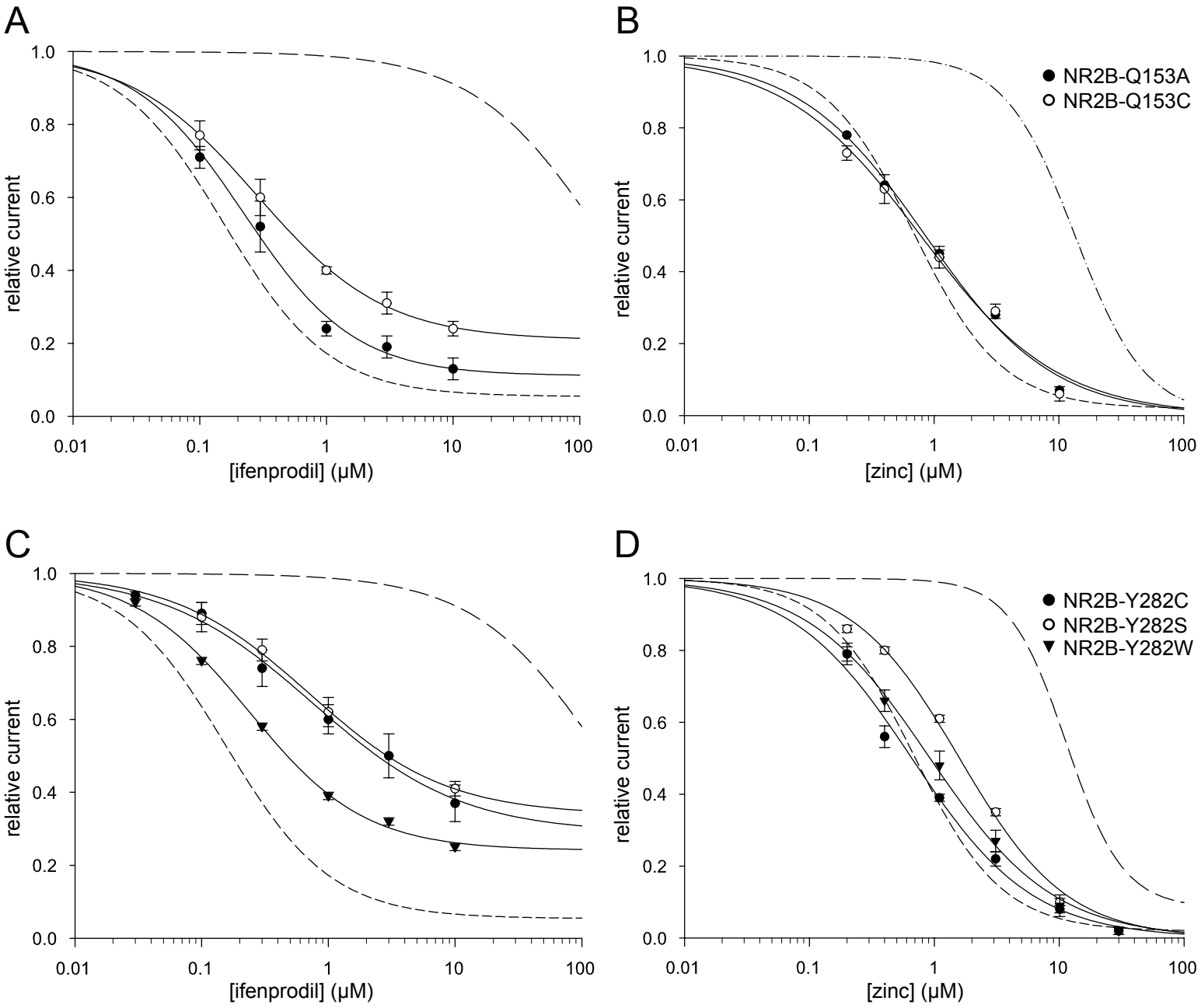


Figure S2

Figure S2: Q153 and Y282 mutations have little effect on ifenprodil apparent affinity.
Ifenprodil and zinc sensitivity of NR1/NR2B receptors substituted with different residues at the NR2B-Q153 or NR2B-Y282 position. In each panel, the dashed curves are the fits of the ifenprodil or zinc dose-response curves of wt NR1/NR2B receptors (short dashes) and receptors truncated for their entire NR2B NTD (NR1/NR2B-ΔNTD receptors, long dashes; see Rachline et al., 2005). Each data point is the mean value of at least three different oocytes. A. Ifenprodil concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Q153 position. B. Zinc concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Q153 position. C. Ifenprodil concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Y282 position. D. Zinc concentration-response curves of NR1/NR2B receptors mutated at the NR2B-Y282 position. The estimated values of IC_{50} are listed in Table 1.

Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by NMDA receptors
Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Léonetti, Anne Le Goff, Karin Alarcon, Jacques Neyton, Hugues-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti
10.1124/mol.108.050971

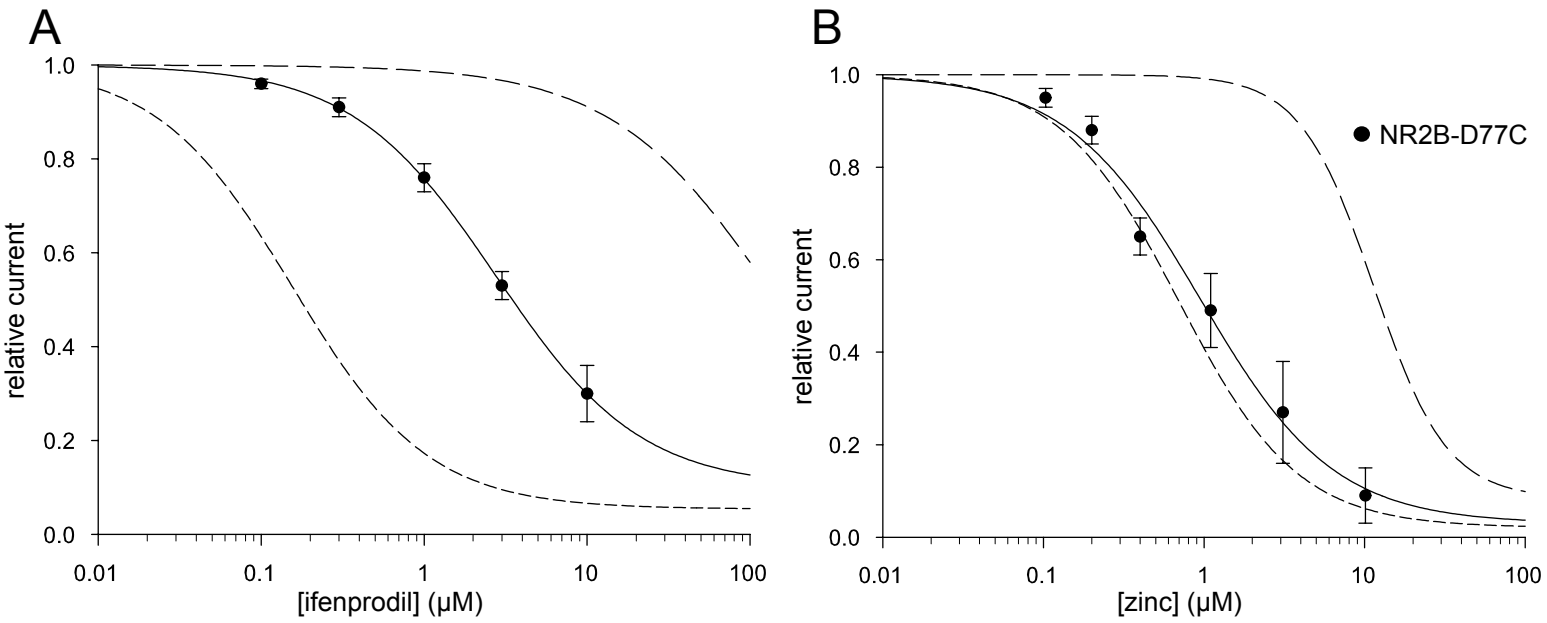


Figure S3

Figure S3: Effects of the NR2B-D77C mutation on ifenprodil and zinc sensitivity.
Ifenprodil and zinc sensitivity of NR1/NR2B receptors substituted with different residues at the NR2B-D77 position. In each panel, the dashed curves are the fits of the ifenprodil or zinc dose-response curves of wt NR1/NR2B receptors (short dashes) and NR1/NR2B-ΔNTD receptors (long dashes). Each data point is the mean value of at least three different oocytes A. Ifenprodil concentration-response curves. B. Zinc concentration-response curves. The estimated values of IC50 are listed in Table 1. Note that the NR2B-D77C mutation significantly reduces ifenprodil sensitivity but not zinc sensitivity.

Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by NMDA receptors

Laetitia Mony, Lucie Krzaczkowski, Manuel Léonetti, Anne Le Goff, Karin Alarcon, Jacques Neyton, Hugues-Olivier Bertrand, Francine Acher, and Pierre Paoletti

10.1124/mol.108.050971

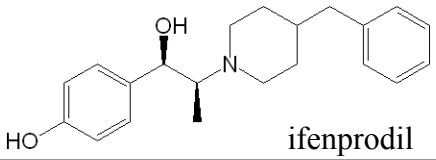
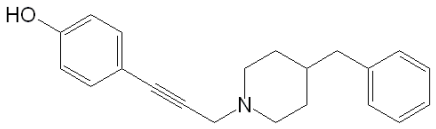
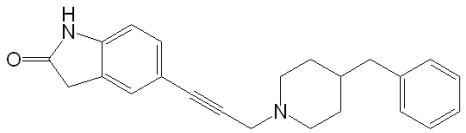
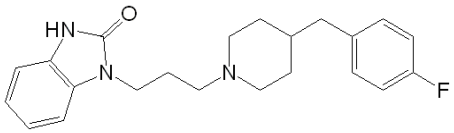
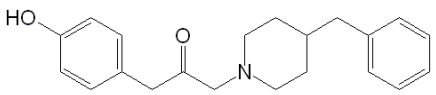
structure	activity		normalized activity
	IC_{50} (μM)	Ki (nM)	
 ifenprodil	0.11	20	1
	0.10		0.9
	0.11		1
	0.11		1
		22.6	1.1

Table S1

Table S1: Molecule dataset used to build the pharmacophore model.
The activities of the molecules on wt NR1/NR2B receptors are from Tamiz et al. (1998), Wright et al. (1999), Wright et al. (2000), Shelkun et al. (2000) and Pinard et al. (2001), respectively. IC50s were determined by electrophysiology on Xenopus oocytes. Ki values were determined by displacement of the NR2B-selective radioligand [3H]Ro 25-6981. The normalized activity represents the ratio of the compound activity over ifenprodil activity.

Supplementary Table references:

Pinard E, Alanine A, Bourson A, Büttelmann B, Gill R, Heitz M-P, Jaeschke G, Mutel V, Trube G and Wyler R (2001) Discovery of (R)-1-[2-Hydroxy-3-(4-hydroxy-phenyl)-propyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-ol: A Novel NR1/2B Subtype Selective NMDA Receptor Antagonist. Bioorg. Med. Chem. Lett. 11:2173-2176.

Tamiz AP, Whittemore ER, Zhou Z-L, Huang J-C, Drewe JA, Chen J-C, Cai S-X, Weber E, Woodward RM and Keana JF (1998) Structure-Activity Relationships for a Series of Bis(phenylalkyl)amines: Potent Subtype-Selective Inhibitors of N-Methyl-D-Aspartate Receptors. J. Med. Chem. 41:3499-3506.
Schelkun RM, Yuen P-W, Serpa K, Meltzer LT, Wise LD, Whittemore ER and Woodward RM (2000) Subtype-selective N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonists: Benzimidazalone and Hydantoin as Phenol Replacements. J.Med. Chem. 43:1892-1897.

Wright JL, Gregory TF, Bigge CF, Boxer PA, Serpa K, Meltzer LT and Wise LD (1999) Subtype-selective N-Methyl-D-aspartate Receptor Antagonists: Synthesis and Biological evaluation of 1-(arylalkynyl)-4-benzylpiperidines. J. Med. Chem. 42:2469-2477.

Wright JL, Gregory TF, Kesten SR, Boxer PA, Sherpa KA, Meltzer LT and Wise LD (2000) Subtype-Selective N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antagonists: Synthesis and Biological Evaluation of 1-(Heteroarylalkynyl)-4-benzylpiperidines. J. Med. Chem. 43:3408-3419.

5.4 Commentaires

Dans ce travail, nous avons proposé un mode de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de la sous-unité GluN2B. L'ancrage moléculaire de l'ifenprodil dans le modèle du NTD de GluN2B a révélé l'existence de deux orientations possibles de la molécule, le groupement phénol étant soit dirigé vers la charnière du domaine, soit dirigé vers l'extérieur de la fente interlobaire. La combinaison d'études de mutagénèse dirigée et de marquage d'affinité sur cystéines a permis de choisir entre ces deux orientations, et de proposer que l'ifenprodil se lie dans le NTD de GluN2B de façon à ce que son groupement phénol interagisse avec des résidus polaires de l'extérieur de la fente interlobaire, alors que son groupement benzyle fait des contacts de Van der Waals avec des résidus hydrophobes de la charnière. Cette étude a permis de révéler cinq nouveaux résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil : T76, D77, D206, Y231 et V262. Parmi ces résidus, Y231 est particulièrement important, sa mutation en alanine rendant les récepteurs GluN1/GluN2B aussi insensibles à l'ifenprodil que ceux pour lesquels le NTD de la sous-unité GluN2B a été supprimé (récepteurs GluN1wt/GluN2B-ΔNTD). Les mutations produisant le plus d'effet sur l'ifenprodil (Y231A, D206K et V262F) perturbent peu la sensibilité pour le zinc. De plus, les mutations Y231A et V262F ne modifient pas la sensibilité aux protons (l'ifenprodil inhibant les récepteurs NMDA par le biais d'une augmentation de la sensibilité aux protons des récepteurs GluN1/GluN2B), ce qui suggère que les résidus Y231 et V262 font partie du site de liaison de l'ifenprodil.

Cependant, si les données de mutagénèse dirigée ont donné des résultats facilement interprétables, les expériences de marquage d'affinité ont été moins concluantes.

5.4.1 Le marquage d'affinité sur cystéines utilisant des dérivés d'ifenprodil thio-réactifs : une approche à succès mitigé

Pour valider l'orientation de l'ifenprodil dans son site de liaison, nous avons décidé d'utiliser deux dérivés d'ifenprodil thio-réactifs, l'un fonctionnalisé au niveau de son extré-

mité phénol (composé **4** de l'Article I), et l'autre fonctionnalisé au niveau de son extrémité benzyle (composé **12** de l'Article I). Nous avons cependant encouru un certain nombre de difficultés pour obtenir des résultats cohérents avec ces composés.

En effet, l'application d'une forte concentration (500 μM) du composé **4** ou du composé **12** entraîne une diminution irréversible des courants issus des récepteurs GluN1/GluN2B sauvages, récepteurs qui ne sont pas supposés former de liaison covalente avec ces composés (voir partie "Matériels et Méthodes" de l'Article II). Une cystéine endogène, C232A, se trouve dans la fente interlobaire du NTD de GluN2B, et pourrait potentiellement réagir avec les composés **4** et **12**. Cependant, ce n'est pas le cas, puisque les récepteurs mutants GluN1wt/GluN2B-C232A sont inactivés de la même façon que les récepteurs sauvages par le composé **12** (voir partie "Matériel et Méthodes" de l'article II). En réalité, même l'incubation des récepteurs sauvages GluN1/GluN2B dans une solution contenant une forte concentration (100 μM) d'ifenprodil, pourtant non chimiquement réactif, entraîne une forte inhibition irréversible des courants issus des récepteurs GluN1/GluN2B (inactivation de l'ordre de 90% ; voir partie "Matériel et méthodes" de l'article II). Il semble donc que les dérivés d'ifenprodil, appliqués à forte concentration, entraînent une inactivation des récepteurs GluN1/GluN2B indépendante de la formation d'une liaison covalente entre l'antagoniste et le récepteur.

Pour déterminer si cette inactivation provient d'une diminution de l'expression des récepteurs GluN1/GluN2B à la membrane des ovocytes ou d'une réelle inhibition des récepteurs NMDA, nous avons étudié l'effet de courtes applications de concentrations croissantes d'ifenprodil sur les récepteurs sauvages GluN1/GluN2B. La FIGURE 5.3 montre qu'après une application courte ($\sim$ 1 min) de 1, 10 ou 100 μM d'ifenprodil et lavage du composé, le courant ne revient pas au niveau initial. Le niveau d'inhibition irréversible est proportionnel à la quantité d'ifenprodil appliquée (FIGURE 5.3). Le fait que des applications courtes d'ifenprodil induisent aussi des effet irréversibles suggère que les diminutions des courants NMDA observées suite aux incubations longues avec les composés **4**,

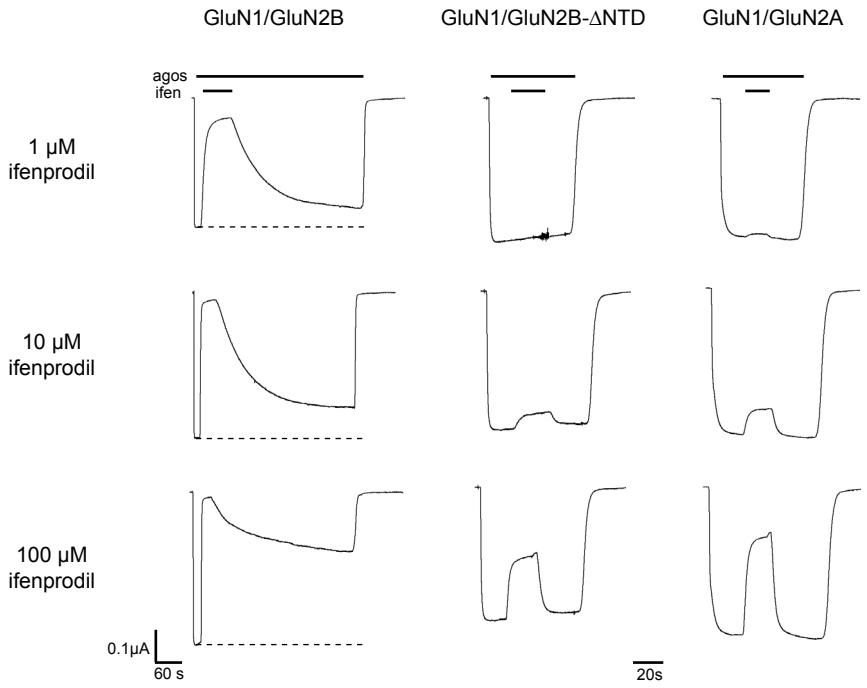


FIGURE 5.3 – Effets de l'application de 1, 10 et 100 μM d'ifenprodil sur les récepteurs GluN1/GluN2B, GluN1/GluN2B-ΔNTD et GluN1/GluN2A. On remarque que, pour les récepteurs GluN1/GluN2B, le courant NMDA après lavage de l'ifenprodil est inférieur au courant NMDA avant application d'ifenprodil.

12 ou avec l'ifenprodil ne proviennent probablement pas d'une diminution de l'expression des récepteurs à la membrane des ovocytes, mais plutôt d'une réelle inactivation des récepteurs NMDA. Cette inactivation n'est pas observable sur les récepteurs contenant une sous-unité GluN2B dans laquelle le NTD a été supprimé (récepteurs GluN1wt/GluN2B-ΔNTD) ou sur les récepteurs GluN1/GluN2A (Figure 5.3). De même, l'incubation pendant 30 min des récepteurs GluN1/GluN2B-ΔNTD dans des solutions contenant 500 μM de composé **12** ne produit pas de diminution irréversible des courants NMDA. L'inactivation des récepteurs sauvages GluN1/GluN2B provient donc de la fixation de l'ifenprodil ou de ses dérivés sur le NTD de la sous-unité GluN2B. Enfin, nous avons aussi vérifié que l'application d'une concentration ultra-saturante de zinc (1 mM) n'induit pas non plus d'inhibition irréversible des récepteurs NMDA GluN1/GluN2B (données non montrées). Cet effet est donc spécifique aux dérivés de l'ifenprodil et provient de la fixation de ces dérivés sur le NTD de la sous-unité GluN2B. Cependant, le mécanisme par lequel de fortes concentrations de dérivés d'ifenprodil induisent une inactivation des récepteurs GluN1/GluN2B n'est pas encore élucidé.

Cette inhibition irréversible "parasite" produite par les dérivés d'ifenprodil est problématique, car nous voulions justement mettre en évidence la formation d'une liaison covalente entre les récepteurs GluN1/GluN2B modifiés et les composés thio-réactifs par une inhibition irréversible des récepteurs modifiés. Comme nous nous sommes aperçus que le degré d'inactivation "parasite" était corrélé à l'affinité du récepteur pour le dérivé d'ifenprodil, nous avons comparé les effets irréversibles des composés **4** et **12** sur les récepteurs dont une position a été mutée en alanine (contrôle, non réactif) et en cystéine, deux mutations qui en général ont le même effet sur la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B. Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence de marquage irréversible avec le composé **12**. Ce composé contient un groupement isothiocyanate sur son extrémité benzyle, extrémité supposée interagir avec des résidus de la charnière dans notre modèle de liaison de l'ifenprodil. La région de la charnière est plus contrainte structu-

ralement que l'extérieur de la fente interlobaire. La mobilité du groupement isothiocyanate est donc probablement limitée, ce qui fait que nous n'avons peut-être pas trouvé la position pouvant réagir avec le composé **12**.

En revanche, nous avons pu mettre en évidence un marquage irréversible pour le composé **4** sur des récepteurs GluN1/GluN2B dans lesquels des cystéines ont été introduites à la périphérie de la crevasse interlobaire. Ainsi, nous avons pu montrer que le groupement phénol de l'ifenprodil se situe à proximité des résidus T76, L205 et D206, comme cela avait été prédit par le modèle proposé de liaison de l'ifenprodil.

5.4.2 Comparaison de notre modèle par homologie avec la structure cristallographique du NTD de GluN2B

Après la publication de notre article, des structures cristallographiques des NTDs des récepteurs AMPA (GluA2 ; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009), kainate (GluK2 ; Kumar et al., 2009) et du NTD de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (Karakas et al., 2009) ont été publiées. Ces structures confirment l'appartenance de ces domaines à la famille LIVBP, mais révèlent aussi quelques différences par rapport aux autres protéines de cette famille, notamment par rapport au domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$ (voir Section 2.3, page 86 pour une étude détaillée de ces domaines). Le NTD de la sous-unité GluN2B a été cristallisée dans une conformation fermée, en présence ou en absence de zinc, mais pas en présence d'ifenprodil (Karakas et al., 2009). La structure du NTD de la sous-unité GluN2B a révélé un caractère complètement inattendu de ce domaine : une torsion d'environ 50° entre le lobe I et le lobe II (Karakas et al., 2009). Une telle torsion n'avait été observée chez aucune des protéines de la famille LIVBP cristallisées, ni même chez les NTDs des autres iGluRs. La conséquence de cette torsion est que les résidus des lobes I et II qui se faisaient face dans les modèles par homologie construits sur la base de la protéine LIVBP ou du domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$ sont éloignés dans la structure cristallographique. Le modèle de liaison de l'ifenprodil que nous avions proposé

doit donc être sérieusement repensé.

Pour définir un nouveau mode de liaison de l'ifenprodil dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B, nous avons essayé d'ancrer l'ifenprodil à l'intérieur du domaine (domaine sous forme apo ; pdb : 3jpw). Cependant, cette opération s'est révélée impossible, la fente interlobaire du NTD cristallisé en configuration fermée étant trop petite pour accommoder l'ifenprodil. Ne pouvant ancrer l'ifenprodil dans la structure cristallisée du NTD de GluN2B, nous avons voulu vérifier la validité du modèle par homologie présenté dans l'article II du NTD de GluN2B (domaine "homo") en le comparant à sa structure cristallographique (domaine "cristallo"). À cause de la torsion du NTD cristallisé, nous avons effectué cette comparaison chaque lobe pris individuellement.

Comparaison des lobes I

Les lobes I des domaines "homo" et "cristallo" s'alignent mal, avec un RMS de $3,6\,\text{Å}$ entre les deux structures. Cette grande différence provient en partie de la boucle α9-α10, correspondant à la boucle 3 des récepteurs kainate (FIGURE 5.4). Dans les iGluRs, cette boucle adopte une conformation complètement différente de la boucle correspondante du domaine de liaison du glutamate de $mGlu_1$ (voir Section 2.3, page 86), d'où l'importante différence observée entre les domaines "homo" et "cristallo". Une autre différence importante concerne l'hélice α1, qui en réalité n'apparaît pas comme une hélice dans le domaine "cristallo" (FIGURE 5.4). Enfin, les structures des boucles tapissant la fente interlobaire au niveau du lobe I diffèrent aussi fortement entre les domaines "homo" et "cristallo". Nous avions proposé que V42, de la boucle β1-α1, interagisse avec le cycle phénol de l'ifenprodil. Dans le domaine "cristallo", V42 ne pointe pas vers la crevasse interlobaire, mais fait plutôt partie du coeur hydrophobe du lobe I, rendant son interaction avec l'ifenprodil improbable.

La plus grande différence au niveau des boucles du lobe I tapissant la fente interlobaire entre les domaines "homo" et "cristallo" réside dans la structure de la boucle β3-α3

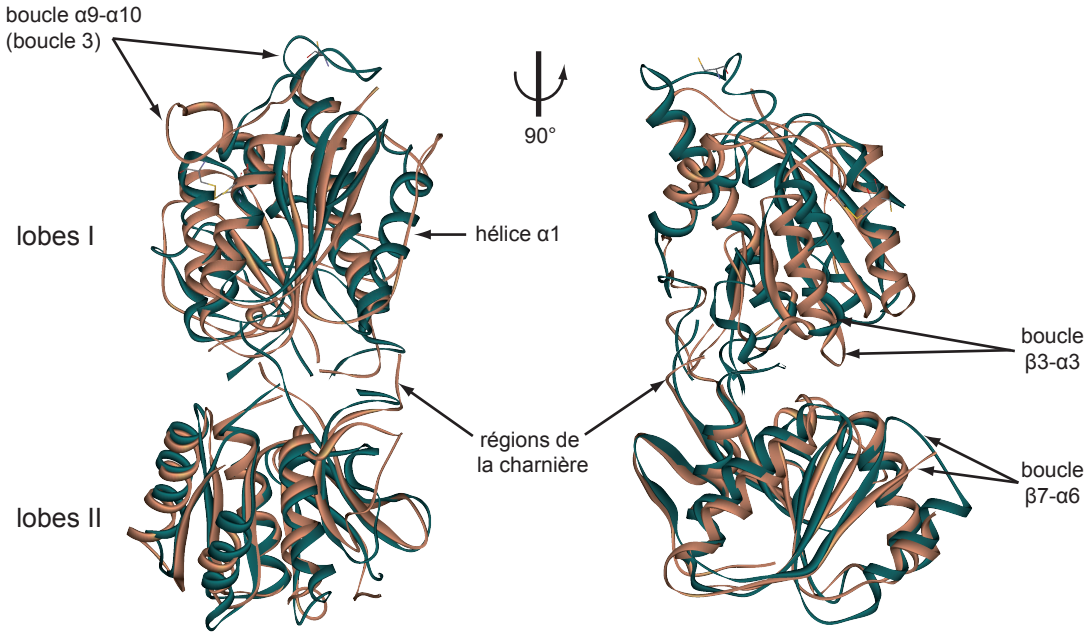


FIGURE 5.4 – Superposition du modèle par homologie publié dans Mony et al. (2009b) et de la structure cristallographique du NTD de GluN2B (pdb : 3jpy ; Karakas et al., 2009). À cause de la torsion apparaissant dans la structure cristallographique, les lobes I et II ont été superposés séparément. On remarque que les lobes II se superposent mieux que les lobes I. Les deux structures sont représentées sous forme de rubans. Vert foncé, modèle par homologie ; saumon, structure cristallographique. Les zones différant beaucoup dans les deux structures sont indiquées par des flèches.

(FIGURE 5.5B). La boucle β3-α3 contient la séquence "DDTDQE", parmi laquelle on trouve D101. La mutation de D101 en alanine diminue très fortement les sensibilités des récepteurs GluN1/GluN2B à l'ifenprodil et au zinc (Perin-Dureau et al., 2002; Rachline et al., 2005). Dans l'article II, nous avions proposé que D101 fasse une liaison ionique avec le groupement ammonium de l'ifenprodil (FIGURE 5.5D). Cependant, les séquences du NTD de GluN2B et de l'ABD de $mGlu_1$ divergeant fortement au niveau de cette boucle, nous n'étions pas surs de la structure de cette boucle. En réalité, dans le domaine "cristallo", D101 ne pointe pas vers la fente interlobaire. Au contraire, il interagit par le biais de liaisons hydrogène avec la thréonine 103 de la boucle β3-α3 ainsi qu'avec la glycine 129 et la sérine 130 de la boucle β4-α4 (FIGURE 5.5C). Ainsi, D101 joue un rôle important dans le maintien des structures des boucles β3-α3 et β4-α4. La boucle β3-α3 contient les résidus D104 et E106 qui contrôlent séléctivement la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B (Perin-Dureau et al., 2002). De plus, la boucle β4-α4 contient le résidu H127, résidu clé dans la sensibilité des récepteurs GluN1/GluN2B au zinc (Rachline et al., 2005). Ainsi, D101 est plutôt un résidu "structural". Son rôle prépondérant dans le contrôle des sensibilités au zinc et à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B proviendrait du fait que ce résidu contrôle la position de résidus appartenant aux sites de liaison du zinc et de l'ifenprodil, à savoir D104, E106 et H127.

On remarque aussi que la boucle β3-α3 du domaine "cristallo" descend beaucoup plus bas dans la fente interlobaire que celle du domaine "homo" et stabilise le domaine fermé par le biais de liaisons hydrogène entre D104 et les résidus du lobe II K233 et D265. Paradoxalement, lors de la construction du modèle par homologie du NTD de GluN2B, nous avions passé beaucoup de temps à essayer de "remonter" cette boucle pour que l'ifenprodil aie la place de se fixer dans l'espace interlobaire. Lorsque le lobe I du domaine "cristallo" est superposé au lobe I du domaine "homo", la boucle β3-α3 du domaine "cristallo" télescope le lobe II du domaine "homo". Ce téléscopage entre la boucle β3-α3 et le lobe II dans un modèle "non tordu" pourrait être une des causes de la torsion du

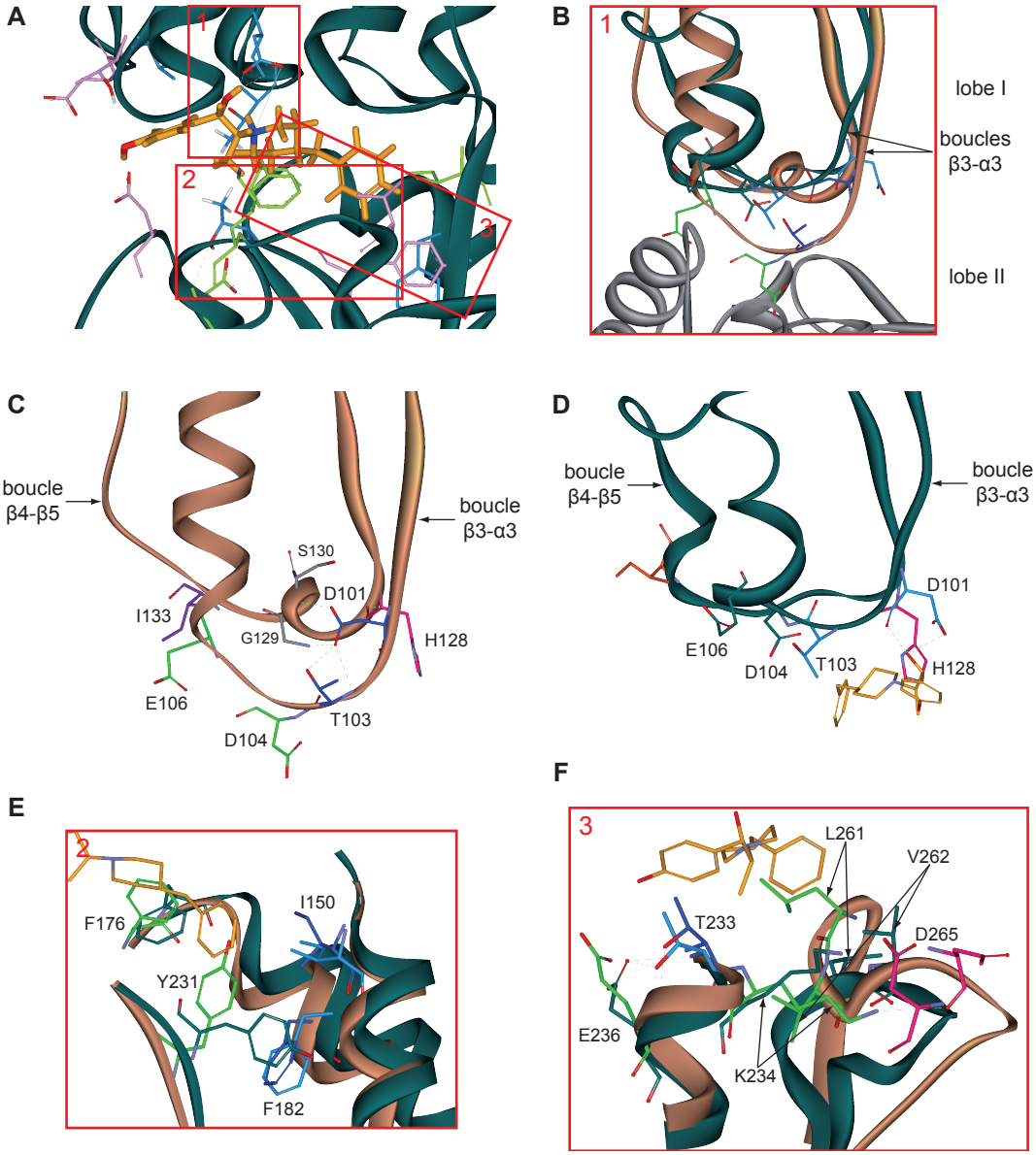
NTD de GluN2B en conformation fermée.

Comparaison des lobes II

Les lobes II des domaines "homo" et "cristallo" se superposent beaucoup mieux, avec un RMS de 2,8 Å entre les deux structures. Le RMS étant égal à la résolution de la structure cristallographique (Karakas et al., 2009), on peut considérer que les deux lobes II sont globalement similaires. La plus grande différence réside dans la structure de la boucle β7-α6 (appelée boucle β7-α7 dans l'article II ; FIGURE 5.4). Dans la boucle β7-α6 du domaine "cristallo", D206 est trop loin de la fente interlobaire pour pouvoir interagir avec l'ifenprodil tel que nous l'avons ancré dans l'article II (FIGURE 5.6). Il en est de même pour T76 et D77 au lobe I, qui sont aussi très éloignés de la fente interlobaire dans le domaine "cristallo" (FIGURE 5.6). Pourtant, nous avons mis en évidence une interaction directe entre l'ifenprodil et ces résidus grâce à des expériences de marquage d'affinité. Il est possible que, lors de la fixation de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B, ces deux boucles se rapprochent de la fente interlobaire.

Les boucles du lobe II β6-α5 et β8-α7, tapissant la fente interlobaire du domaine "homo" se superposent très bien avec les boucles correspondantes du domaine "cristallo". On remarque en particulier que les résidus contrôlant à la fois les sensibilités à l'ifenprodil et au zinc, considérés comme des résidus plutôt "structuraux", sont très bien superposés entre les domaines "homo" et "cristallo", même au niveau de leur chaîne latérale (c'est la cas de F182 dans la boucle β6-α5, FIGURE 5.5E ; et de T233 dans la boucle β8-α7, FIGURE 5.5F). Les résidus de ces boucles contrôlant sélectivement la sensibilité à l'ifenprodil (F176, Y231, E236 et K234) ne divergent quant à eux que par l'orientation de leur chaîne latérale, orientation susceptible de varier suite à la liaison d'un ligand.

Cependant la boucle β9-β10 diverge entre les domaines "homo" et "cristallo". Dans notre modèle de liaison de l'ifenprodil, nous avions prédit que V262 interagissait avec le cycle aromatique benzylique de l'ifenprodil. Or dans le domaine "cristallo", V262 pointe


A
1
2
3
B
1
lobe I
boucles
β3-α3
lobe II
C
boucle
β4-β5
boucle
β3-α3
S130
D101
I133
G129
H128
E106
T103
D104
D
boucle
β4-β5
boucle
β3-α3
D101
E106
D104
T103
H128
E
2
F176
I150
Y231
F182
F
3
L261
V262
T233
D265
E236
K234

vers le coeur hydrophobe de la protéine. Ainsi, les données de mutagénése dirigée sur V262, que nous avions interprétées par une interaction de type hydrophobe entre V262 et l'ifenprodil, consiste probablement en une interaction de type hydrophobe entre V262 et le coeur de la protéine, la perturbation de cette interaction modifiant de façon indirecte la sensibilité à l'ifenprodil. L261, quant à lui, pointe bien vers la crevasse interlobaire et pourrait potentiellement interagir avec l'ifenprodil.

Ainsi, alors que les lobes I diffèrent complètement entre notre modèle par homologie et la structure cristallographique du NTD de GluN2B, les lobes II des deux structures sont globalement similaires. Par conséquent, les interactions avec le lobe I que nous avions prédites pour la liaison de l'ifenprodil sont probablement inexactes. En revanche, les interactions que nous avions prédites pour l'ifenprodil au lobe II restent tout à fait plausibles.

Une structure différente du NTD de GluN2B en présence d'ifenprodil ?

Le fait qu'on ne puisse ancrer l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B cristallisé en présence ou en absence de zinc laisse penser que ce domaine adopte une conformation différente en présence d'ifenprodil, étant soit moins fermé, soit moins "tordu" que dans la forme "apo" ou en présence de zinc. Si on regarde la distribution des résidus contrôlant

FIGURE 5.5 – Étude détaillée des différences entre le modèle par homologie (qu'on appelera "homo") et la structure cristallographique (qu'on appellera "cristallo") du NTD de GluN2B. Les codes couleurs pour les deux structures sont identiques à ceux de la FIGURE 5.4. A, Site de liaison de l'ifenprodil dans le modèle par homologie. Voir Article II pour la légende. B, Superposition des boucles β3-α3 et β4-β5 cristallo et homo. Le lobe II du modèle par homologie est représenté en gris. On remarque que la boucle β3-α3 cristallo se téléscope avec le lobe II. B, C, détails des boucles β3-α3 et β4-β5 cristallo (B) et homo (C). Les résidus contrôlant la sensibilité de l'ifenprodil et/ou du zinc sont représentés sous-forme de bâtonnets avec des codes couleurs adaptés de Mony et al. (2009b) : vert, résidus contrôlant la sensibilité pour l'ifenprodil uniquement (vert clair = cristallo, vert foncé = homo) ; bleu, résidus contrôlant à la fois les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil (bleu foncé = cristallo, bleu clair = homo) ; fushia, résidus contrôlant uniquement la sensibilité au zinc. I133, un nouveau résidu interagissant potentiellement avec l'ifenprodil, est représenté en violet (cristallo) et orange foncé (homo). Dans D, l'ifenprodil est réprésenté sous forme de bâtonnets oranges. E, Superposition de la région proche de la charnière supposée interagir avec le groupement benzyle de l'ifenprodil. F, superposition des boucles β8-α7 et β9-β10. Pour E et F, les codes couleurs sont les mêmes que en C et D.

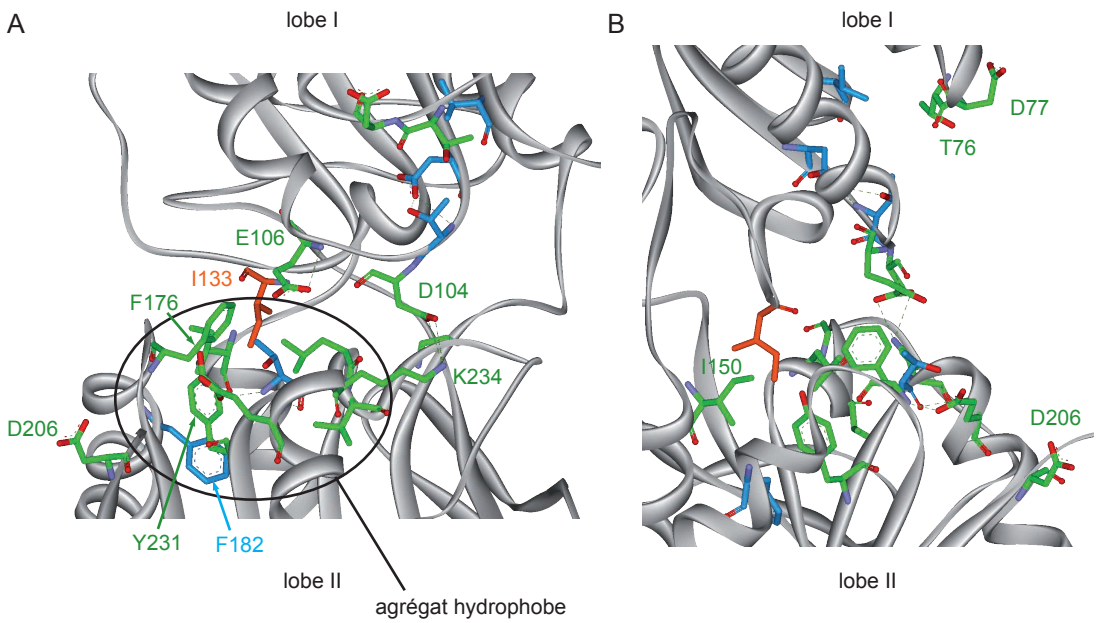


FIGURE 5.6 – Localisation des résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B. Représentations sous forme de rubans de la structure cristallographique apo du NTD de GluN2B (pdb : 3jpw ; Karakas et al., 2009) vue de face (charnière en arrière plan, A) et tourné de 90°, vu depuis sa face putative de dimérisation (B). Les résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil sont représentés sous forme de bâtonnets. Les codes couleur sont ceux de l'article II : vert, résidus contrôlant la sensibilité pour l'ifenprodil uniquement ; bleu, résidus contrôlant à la fois les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil. I133, un nouveau résidu interagissant potentiellement avec l'ifenprodil, est représenté orange foncé. On note que les résidus interagissant avec l'ifenprodil au lobe II et les résidus de la boucle β4-β5 (dont I133) forment un agrégat hydrophobe compact.

la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B, on remarque que les résidus du lobe I et du lobe II sont décalés, suggérant que le NTD serait peut-être moins "tordu" en présence d'ifenprodil. Dans la structure "tordue", un résidu hydrophobe, I133, pointe vers la crevasse interlobaire et fait face aux résidus du lobe II contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil (FIGURE 5.6). La mutation de ce résidu en alanine produit un phénotype atypique, l'inhibition par l'ifenprodil des récepteurs GluN1wt/GluN2B-I133A étant biphasique, avec une première inhibition d'$IC_{50} = 0,04\,\mu M$ qui plafonne à 38 %, et une deuxième inhibition, totale, d'$IC_{50} = 94\,\mu M$ (Karakas et al., 2009). Karakas et al. (2009) ont attribué la deuxième inhibition au blocage dépendant du potentiel membranaire induit par l'ifenprodil à forte concentration, et la première inhibition à l'action de l'ifenprodil sur le NTD de GluN2B. Ainsi, si la mutation de I133 perturbe l'inhibtion par l'ifenprodil des récepteurs NMDA, elle ne semble pas détruire le site de liaison de ce composé, puisque l'ifenprodil inhibe les récepteurs mutants GluN1/GluN2B-I133A avec une IC_{50} plus faible que pour les récepteurs sauvages. Il n'est donc pas clair que ce résidu appartienne au site de liaison de l'ifenprodil, et sa mutation ne permet donc pas de valider le fait que l'ifenprodil se lie, comme le zinc, dans une forme "tordue" du NTD de GluN2B.

De façon intéressante, on remarque que, dans la forme fermée du NTD de GluN2B cristallisé, les résidus hydrophobes du lobe II qui contrôlent la sensibilité à l'ifenprodil (I150, F176, F182, Y231 et L261) forment un agrégat hydrophobe compact avec les résidus hydrophobes leur faisant face (I133, mais aussi M132 et M134)(FIGURE 5.6). On pourrait imaginer que cette forte interaction hydrophobe entre ces résidus des lobes I et II soit, en plus d'une probable importante flexibilité de charnière (voir Section 2.3), une des origines de la torsion entre les deux lobes et du degré de fermeture important du domaine, même en l'absence de ligand. La présence de cet agrégat hydrophobe suggère en outre que la forme fermée du NTD de la sous-unité GluN2B est relativement stable, ce qui est en accord avec les données de Gielen et al. (2009) qui indiquent ce domaine passe la majeure partie de son temps à l'état fermé.

5.4.3 Pourquoi l'ifenprodil n'inhibe-t-il pas les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A ?

Une des questions qui reste en suspens à la suite de cette étude est : "pourquoi l'ifenprodil n'inhibe-t-il pas les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A ?". L'échange des NTDs entre les sous-unités GluN2A et GluN2B permet l'échange des sensibilités à l'ifenprodil (Perin-Dureau et al., 2002 et voir FIGURE 3.5, page 114). Les déterminants moléculaires à l'origine de la sélectivité de l'ifenprodil pour la sous-unité GluN2B sont donc très certainement localisés sur le NTD de la sous-unité GluN2. Cependant, sur les 19 résidus dont la mutation modifie la sensibilité à l'ifenprodil (Perin-Dureau et al., 2002; Mony et al., 2009b; Karakas et al., 2009), 17 sont strictement conservés entre les NTDs de GluN2A et GluN2B (mais pas dans les NTDs de GluN2C et de GluN2D). Parmi les deux résidus non strictement conservés, GluN2B-T233 est substituée par un résidu homologue, une sérine. Seul GluN2B V42 n'est pas conservé dans GluN2A, étant remplacé par une glycine. La nature des résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil ne permet donc pas d'expliquer la sélectivité des dérivés de l'ifenprodil pour la sous-unité GluN2B. Trois hypothèses sont alors envisageables pour expliquer cette sélectivité.

Hypothèse 1 : il existe des boucles dans la fente interlobaire du NTD de GluN2A qui ne permettent pas la liaison de l'ifenprodil

Bien que les résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil soient globalement conservés dans les NTDs de GluN2B et GluN2A, il est possible que des résidus situés ailleurs dans la séquence empêchent indirectement l'ifenprodil de se fixer dans le NTD de GluN2A, soit en modifiant l'orientation des résidus suppposés contrôler la sensibilité à l'ifenprodil, soit en modifiant l'orientation de boucles contenant ces résidus.

Pour essayer d'identifer les régions du NTD de GluN2B responsables de la fixation sélective de l'ifenprodil, nous avons comparé les séquences des NTDs de GluN2A et GluN2B (FIGURE 5.7). L'alignement révèle que trois régions sont fortement divergentes

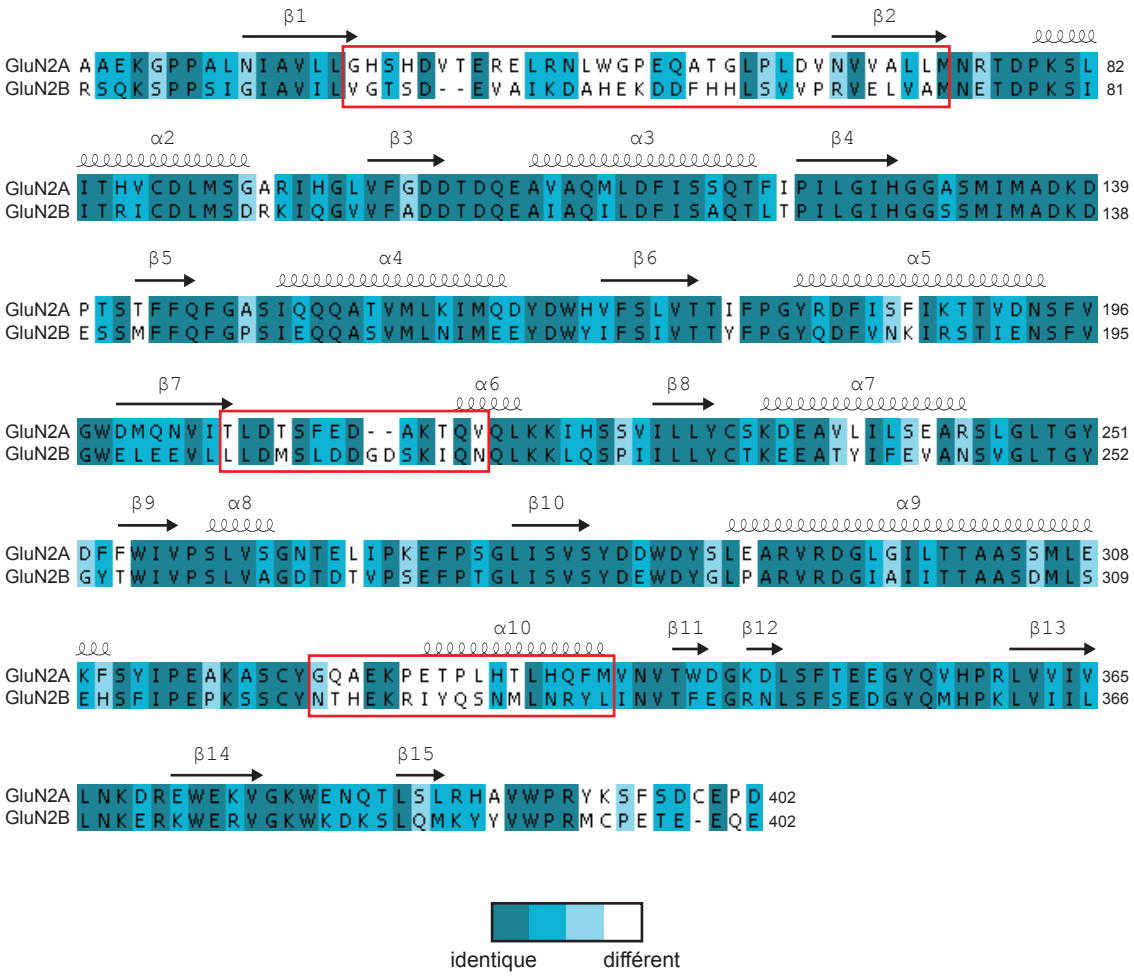


FIGURE 5.7 – Trois régions divergent fortement entre les séquences des NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B. Alignement de séquences entre les NTDs de GluN2A et GluN2B coloré en fonction des similarités entre résidus. Les hélices α (ressorts) et les brins β (flèches) indiqués sont issus de la structure cristallographique du NTD de GluN2B (pdb : 3jpw ; Karakas et al., 2009). La numérotation des hélices α commence à $\alpha 2$ pour rester cohérent avec la numérotation des structures secondaires des iGluRs, l'hélice $\alpha 1$ n'étant pas présente dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B. Les trois régions fortement divergentes sont encadrées en rouge.

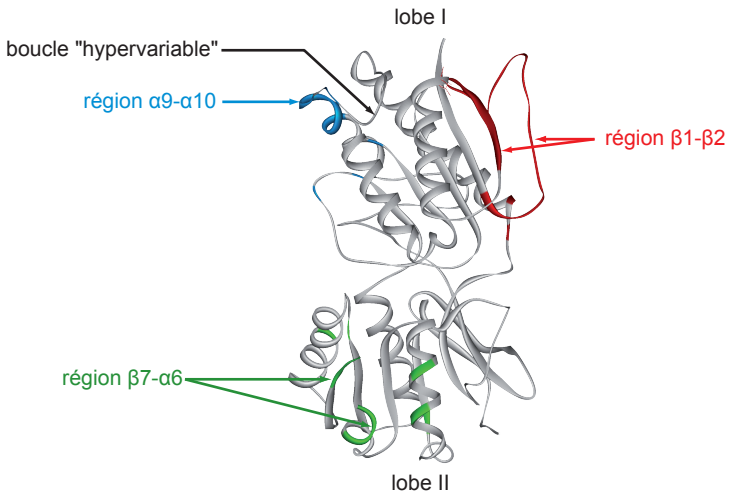


FIGURE 5.8 – Localisation sur la structure cristallographique du NTD de GluN2B (pdb : 2jpw ; Karakas et al., 2009) des régions divergentes entre les NTDs de GluN2A et de GluN2B. Ont été coloriés les résidus ne partageant aucune homologie entre les NTDs de GluN2A et GluN2B (en blanc dans l'alignement de la FIGURE 5.7). Les résidus divergents sont coloriés par grandes régions du NTD

entre les NTDs des sous-unités GluN2A et GluN2B : la région située entre les brins β1 et β2, la boucle β7-α6 et la région entre les hélices α9-α10, appelée "boucle hypervariable" par Karakas et al. (2009). Les régions β1-β2 et β7-α6 contiennent des boucles tapissant la fente interlobaire du NTD, ainsi que des résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil dans GluN2B (V42 et D206). Il est donc possible que la différence de structure de ces boucles entre GluN2A et GluN2B soit à l'origine de la sélectivité du NTD de GluN2B pour l'ifenprodil. De plus, la région β1-β2 de GluN2A contient deux histidines qui ne sont pas présentes dans la région correspondante de GluN2B. Ces résidus encombrants pourraient empêcher l'ifenprodil de se fixer dans le NTD de GluN2A. La région α9-α10, quant-à elle, est située sur le sommet du lobe I, loin du site de liaison putatif de l'ifenprodil (voir Hypothèse 3).

L'implication des régions β1-β2 et β7-α6 dans la sensibilité à l'ifenprodil a été testée en construisant des chimères échangeant tout ou partie de ces régions. Il a été montré au laboratoire que la substitution de la région de GluN2A située entre les résidus 1 et 67 par la région correspondante de GluN2B (région β1-β2) ne permet pas de conférer une

sensibilité à l'ifenprodil aux récepteurs GluN1/GluN2A modifiés (voir discussion de Mony et al., 2009b).

La boucle β7-α6 est susceptible d'adopter des configurations différentes entre les NTDs de GluN2A et GluN2B car la boucle du NTD de GluN2B est plus longue de deux résidus que celle de GluN2A. Chez les mGluRs, il été montré que la mauvaise affinité du L-AP4 pour le sous-type $mGlu_7$ par rapport au sous-type $mGlu_4$ provient en partie d'une boucle du domaine de liaison du glutamate équivalente à la boucle β7-α6 du NTD des récepteurs NMDA, qui est plus longue dans $mGlu_7$ que dans $mGlu_4$ (Rosemond et al., 2004). On pourrait donc imaginer que la différence de longueur entre les boucles β7-α6 des NTDs de GluN2A et GluN2B aie une importance dans le contrôle de la spécificité pour l'ifenprodil. Les résultats obtenus par échange des régions β7-α8 entre GluN2A et GluN2B ne sont cependant pas concluants. En effet, sur la sous-unité GluN2B, le remplacement des résidus M207 à D211 ("MSLDD") par la séquence correspondante de GluN2A, à savoir "TSF" (voir alignement de l'article II), a un effet faible sur la sensibilité à l'ifenprodil ($IC_{50} = 0.78 \pm 0.02$ nM, $n = 3$, pour les récepteurs GluN1wt/GluN2B-TSF contre $IC_{50} = 0.18 \pm 0.01$ nM, $n = 3$, pour les récepteurs GluN1wt/GluN2Bwt dans la même série d'expériences). Ces résultats indiquent donc que, tant que l'on conserve GluN2B-D206, qui contrôle fortement la sensibilité à l'ifenprodil, la longueur de la boucle β7-α6 n'a qu'un effet modéré sur la sensibilité à l'ifenprodil. De plus, les récepteurs GluN1/GluN2A pour lesquels la région du lobe II située entre les brins β6 et β8 a été remplacée par la region correspondante de GluN2B (et contenant donc la boucle β7-α6 de GluN2B) sont très peu inhibés par 1 μM d'ifenprodil (7 ± 2% d'inhibition, $n = 3$, -60 mV). Cette région ne semble donc pas suffisante pour contrôler la sensibilité à l'ifenprodil.

Il reste une région de la fente interlobaire que nous n'avons pas exploré, et qui pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la sensibilité à l'ifenprodil. Au niveau du deuxième segment de la charnière du NTD, il existe une zone sensiblement divergente entre GluN2A et GluN2B, entre les résidus GluN2B-287 à GluN2B-289 (séquence "SLE" dans GluN2A

et "GLP" dans GluN2B ; voir FIGURE 5.7). Dans la structure cristallographique du NTD de GluN2B, cette petite région interagit avec l'arginine 292, dont la mutation en alanine diminue très fortement la sensibilité à l'ifenprodil (Karakas et al., 2009). Les résidus glycine et proline induisant des conformations de boucles particulières, il est possible que la structure de cette région soit différente entre les NTDs de GluN2A et GluN2B, et que cela influe sur la position de GluN2A-R291, perturbant une fixation potentielle de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2A. Il serait donc intéressant de vérifier la sensibilité à l'ifenprodil de récepteurs GluN1/GluN2B possédant des mutations dans cette région.

Hypothèse 2 : l'ifenprodil peut se lier au NTD de GluN2A, mais il n'est pas capable de provoquer sa fermeture

Devant l'impossibilité de pouvoir expliquer la différence d'affinité pour l'ifenprodil entre les sous-unités GluN2A et GluN2B par des différences au niveau des acides aminés formant le site de liaison putatif de l'ifenprodil, nous avons envisagé la possiblité que l'ifenprodil puisse se lier au NTD de GluN2A de la même façon qu'au NTD de GluN2B, mais qu'il ne soit pas capable d'induire une inhibition des récepteurs contenant la sous-unité GluN2A. Il a été montré en effet que l'ifenprodil inhibe les récepteurs GluN1/GluN2B par le biais d'une augmentation de la sensibilité aux protons de ces récepteurs (Pahk and Williams, 1997; Mott et al., 1998). Les récepteurs GluN1/GluN2A étant beaucoup moins sensibles aux protons (pH d'$IC_{50} \sim 6,9$; voir Section 3.1), dans le cas d'une fixation éventuelle de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2A, il se pourrait que l'inhibition provoquée par l'ifenprodil soit alors trop faible pour être détectée à pH 7,3. De plus, Gielen et al. (2009) ont proposé que le NTD de la sous-unité GluN2A passe plus de temps dans l'état ouvert que celui de GluN2B. On peut alors supposer que l'ifenprodil lié au NTD de GluN2A n'apporte pas l'énergie suffisante pour stabiliser l'état fermé du NTD. Dans ce cas, augmenter l'inhibition par les protons ou favoriser la transition vers l'état fermé du NTD (et ainsi diminuer la Po ; Gielen et al., 2009) des récepteurs GluN1/GluN2A pourrait peut-être

permettre de révéler une inhibition par l'ifenprodil sur ces récepteurs.

Cependant certaines données de la littérature rendent cette hypothèse improbable. En effet, des expériences de liaison d'ifenprodil radioactif sur domaine isolé ont montré que l'ifenprodil est capable de se lier au NTD isolé de la sous-unité GluN2B (mais aussi sur le NTD de la sous-unité GluN1, voir Hypothèse 3), mais pas sur le NTD de la sous-unité GluN2A, favorisant ainsi l'hypothèse 1 (Han et al., 2008).

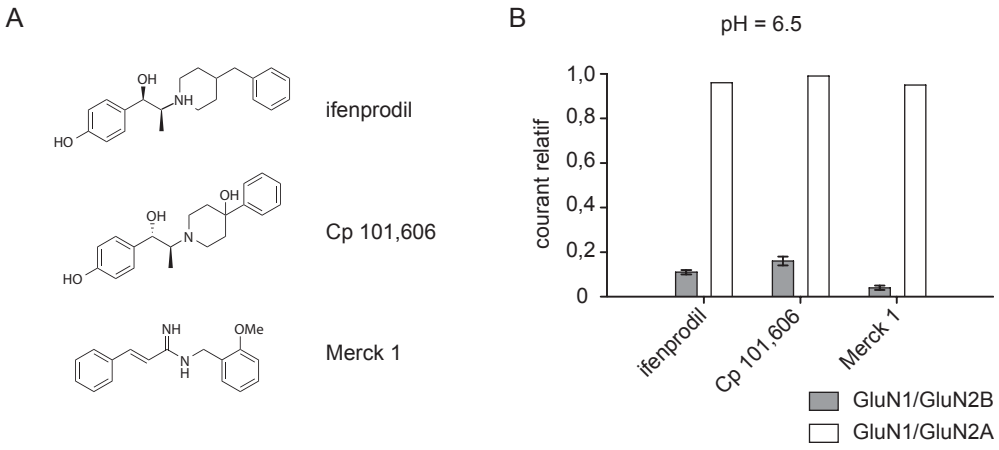


FIGURE 5.9 – Les dérivés de l'ifenprodil n'inhibent pas les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2A à pH acide. A, Structures chimiques des dérivés de l'ifenprodil utilisés. La dénomination "Merck 1" vient de Kiss et al. (2005). B, Inhibitions induites par 1 μM de composé sur les récepteurs GluN1/GluN2B et GluN1/GluN2A sauvages à pH = 6,5. Les rapports des courants en présence d'agonistes et de 1 μM de composé sur les courants en présence d'agonistes seulement (courants relatifs) sont, pour les récepteurs GluN1/GLuN2B et GluN1/GluN2A : 0.11 ± 0.01, $n = 3$, et 0.96, $n = 1$, pour l'ifenprodil ; 0.16 ± 0.02, $n = 3$, et 0.99, $n = 1$, pour Cp 101,606 ; 0.04 ± 0.01, $n = 3$, et 0.95, $n = 1$, pour Merck 1.

De plus, nous avons testé au laboratoire l'effet de l'ifenprodil sur des récepteurs GluN1/GluN2A dans des conditions où ces derniers sont inhibés de façon importante par les protons. Nous avons tout d'abord testé l'effet de différents antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B sur les récepteurs sauvages GluN1/GluN2A à pH 6,5, un pH auquel ces récepteurs sont fortement inhibés par les protons (80 % d'inhibition). Cependant l'application de 1 μM d'ifenprodil, de Cp 101,606 ou de Merck 1 ne produit acune inhibition sur les récepteurs GluN1/GluN2A, alors que les mêmes concentrations inhibent fortement les récepteurs GluN1/GluN2B (FIGURE 5.9). Nous avons aussi montré que les

récepteurs chimériques GluN1/GluN2A dont la sous-unité GluN2A possède la région β6-β8 de la sous-unité GluN2B (récepteurs GluN1wt/GluN2A-2B(175-227) ; voir Article IV) sont très peu inhibés par 1 μM d'ifenprodil ($I_{ifen}/I_0 = 0,93 \pm 0,02$, $n = 3$). Pourtant, ce récepteur chimérique présente une sensibilité au pH accrue par rapport aux récepteurs GluN1/GluN2A (pH d'$IC_{50} = 7,19$, voir Article IV). Nos résultats et ceux de la littérature indiquent donc que la faible sensibilité au pH des récepteurs GluN1/GluN2A n'est pas à l'origine de leur absence de sensibilité à l'ifenprodil.

Nous avons de plus mis en évidence que les récepteurs GluN1/GluN2A-Y281A, dont la Po est fortement diminuée par rapport aux récepteurs sauvages GluN1/GluN2A, ne sont pas non plus sensibles à l'ifenprodil.

Hypothèse 3 : Les NTD des sous-unités GluN2A et GluN2B dimérisent de façon différente avec le NTD de GluN1

La dernière région divergente entre les NTDs de GluN2A et GluN2B se situe entre les hélices α9 et α10. Cette région est située au sommet du lobe I du NTD, loin du site putatif de liaison de l'ifenprodil. Elle contient la boucle "hypervariable" (Karakas et al., 2009), qui correspond à la boucle 3 des récepteurs kainate (Kumar et al., 2009 ; et voir Chapitre 2, Section 2.3, page 86). Dans les dimères de NTDs des récepteurs AMPA et kainate, cette boucle se projette dans l'interface de dimérisation entre les lobes I et interagit avec le protomère adjacent (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009 et voir Section 2.3). Comme cette boucle est conservée au sein d'une même classe de récepteurs (AMPA ou kainate), mais pas entre classes, il a été proposé que la boucle 3 soit un déterminant de la sélectivité de l'association entre sous-unités d'une même classe. Si l'on suppose que les NTDs des récepteurs NMDA forment des hétérodimères GluN1/GluN2 (comme nos données de l'article IV le suggèrent), il est possible que cette boucle, qui est différente entre les NTDs de GluN2A et GluN2B, induise une organisation différente des dimères de NTDs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. Ceci, en retour, pourrait empêcher

une fixation éventuelle de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2A.

En effet, des études de muténèse dirigée et de liaison d'ifenprodil radioactif sur domaine isolé suggèrent que la sous-unité GluN1 pourrait aussi contenir le site de liaison de l'ifenprodil (Masuko et al., 1999; Han et al., 2008 et voir Chapitre 3, Section 3.2.2, page 112). Han et al. (2008) ont en effet montré que le NTD isolé de la sous-unité GluN1 était capable de lier l'ifenprodil radioactif avec une constante de dissociation similaire à celle de la liaison de l'ifenprodil sur le NTD de GluN2B ($K_d = 0,18\,\mu M$ pour le NTD de GluN1 et $K_d = 0,21\,\mu M$ pour le NTD de GluN2B). De plus, Masuko et al. (1999) ont mis en évidence un résidu, D130, dont la mutation en asparagine abolit l'inhibition par l'ifenprodil sans modifier la sensibilité au pH des récepteurs GluN1wt/GluN2B-D130N. De façon intéressante, D130 est situé dans la boucle équivalente de la boucle 1 des NTDs des récepteurs AMPA et kainate (voir Chapitre 2, Section 2.3, page 86). Dans les dimères de NTDs de récepteurs kainate, cette boucle se projette dans la fente interlobaire du protomère voisin. La boucle 1 des récepteurs NMDA étant encore plus longue que celle des récepteurs kainate (voir alignement en Annexe), on peut imaginer une configuration où la boucle 1 du NTD de la sous-unité GluN1 se projetterait dans la crevasse interlobaire du NTD de la sous-unité GluN2B (à supposer, toujours, que les NTDs des récepteurs NMDA forment des hétérodimères GluN1/GluN2B, ce que les données de l'article IV laissent à penser). Dans ce cas, GluN1-D130 serait à proximité des résidus GluN2B-D206, GluN2B-T76 et GluN2B-D77 et pourrait alors interagir avec la partie phénol de l'ifenprodil (Figure 5.10). Dans le cas de figure où les dimères de NTDs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B n'adopteraient pas la même organisation à cause de leur boucle 3 différente, il est possible que, dans le dimère GluN1/GluN2A, D130 ne pointe pas dans la fente interlobaire du NTD de GluN2A et que cela ne permette pas une fixation de l'ifeprodil.

Nous avons voulu vérifier que D130 pouvait effectivement pointer vers la crevasse interlobaire du NTD de GluN2B et interagir avec la partie phénol de l'ifenprodil. Pour

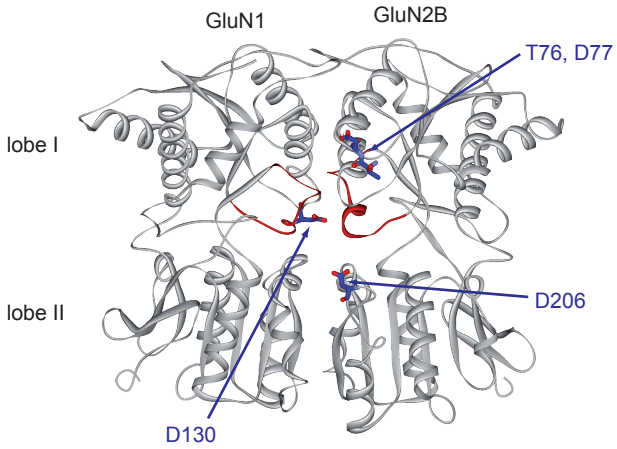


FIGURE 5.10 – Modèle par homologie d'un dimère de NTDs GluN1/GluN2B construit à partir des structures cristallographiques des dimères de NTD des sous-unités GluA2 (pdb : 3h5v ; Jin et al., 2009 et GluK2 (pdb : 3h6g ; Kumar et al., 2009). Les résidus GluN1-D130, GluN2B-D206, GluN2B-T76 et GluN2B-D77 sont représentés sous forme de bâtonnets dont les carbones sont colorés en bleu. Les boucles 1 des NTDs de GluN1 et GluN2B sont colorées en rouge. Dans ce modèle, D130 pointe vers la fente interlobaire du NTD de GluN2B.

cela, nous avons réalisé une expérience de marquage d'affinité sur cystéines sur la position GluN1-D130 avec le composé thio-réactif **4** décrit par Alarcon et al. (2008), selon le protocole utilisé dans l'Article II. Si GluN1-D130 interagit effectivement avec le groupement phénol de l'ifenprodil, le composé **4**, substitué à ce niveau par un groupement thio-réactif, devrait inhiber de façon irréversible les récepteurs GluN1-D130C/GluN2B. Nous n'avons pu cependant mettre en évidence d'inhibition irréversible des récepteurs GluN1-D130C/GluN2B en présence du composé **4**, le rapport des courants NMDA avant et après incubation (I_{incub}/I_0) étant de $1,4 \pm 0,3$ ($n = 6$) pour les récepteurs GluN1-D130C/GluN2Bwt, contre 1.3 ± 0.3 ($n = 5$) pour les récepteurs GluN1-D130A/GluN2Bwt. Cette absence de marquage irréversible n'implique pas forcément que D130 ne pointe pas vers la crevasse interlobaire de GluN2B. En effet, la mutation de D130 en alanine ou en cystéine diminuant fortement la sensibilité à l'ifenprodil, il est possible que le composé **4**, qui inhibe les récepteurs GluN1/GluN2B sauvages avec une IC_{50} environ cent fois supérieure à celle de l'ifenprodil ($IC_{50} = 14\,\mu M$; Alarcon et al., 2008), ne se fixe pas du tout dans le NTD de GluN2B. Ceci expliquerait d'ailleurs qu'aucune inhibition "parasi-

te", due à l'application d'un dérivé d'ifenprodil à forte concentration, n'est visible sur les récepteurs contrôle GluN1-D130A/GluN2Bwt. Une façon de résoudre ce problème serait de substituer en cystéine des positions adjacentes à GluN1-D130, qui, elles, affectent peu la sensibilité à l'ifenprodil.

Une autre façon de mettre en évidence que D130 est proche de la fente interlobaire de GluN2B serait de coupler, à l'aide de composés thio-réactifs bifonctionnels tels que les composés méthane-thiosulfonate (MTS), les sous-unités GluN1 et GluN2B en introduisant des cystéines à la position GluN1-D130 et à une position proche du bord de la fente interlobaire de GluN2B, telle que D206, T76 ou D77.

L'origine de la sélectivité de l'ifenprodil pour la sous-unité GluN2B n'est donc toujours pas connue. Au vu de nos données et de celles de la littérature, nous pouvons éliminer l'hypothèse disant que cette sélectivité est due à une mauvaise transduction de la liaison de l'ifenprodil en fermeture du canal ionique chez les récepteurs contenant la sous-unité GluN2A (problème de "gating"). Il semblerait plutôt que l'origine de la sélectivité soit entièrement contenue dans le NTD de GluN2A (problème de "binding", l'ifenprodil ne peut pas se lier à l'intérieur du NTD de GluN2A), même si on ne peut complètement exclure l'hypothèse d'un arrangement différent au sein d'éventuels dimères de NTDs GluN1/GluN2A et GluN1/GluN2B. Cependant, individuellement, les fortes divergences entre les régions β1-β2 au lobe I et β6-α7 au lobe II ne permettent pas d'expliquer la sélectivité de l'ifenprodil pour la sous-unité GluN2B. Il est possible que les déterminants moléculaires de cette sélectivité soient dispersés dans la séquence des NTDs, impliquant que seul le transfert du NTD entier de GluN2B sur la sous-unité GluN2A permette le transfert de la sensibilité à l'ifenprodil. Il est en outre possible que cette sélectivité proviennent de quelques résidus clés ne pointant pas vers la crevasse interlobaire mais maintenant des boucles importantes pour la liaison de l'ifenprodil. Enfin, on pourrait imaginer que l'orientation relative des lobes I et II dans le NTD de GluN2A ne permette pas une liaison de

l'ifenprodil. Les modèles par homologie que nous avons générés à partir de la structure cristallographique du VFD de $mGlu_1$ ne sont pas assez précis pour pouvoir comparer des différences subtiles entre les NTDs de GluN2A et GluN2B. La structure cristallographique du NTD de GluN2B, ne pouvant accommoder l'ifenprodil dans sa fente interlobaire, n'apporte pas non plus d'éléments de réponse à ce sujet. Seules une structure cristallographique de la poche de liaison de l'ifenprodil permettrait éventuellement de résoudre cette question.

Chapitre 6

Identification par criblage virtuel de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA

6.1 Contexte

Dans l'article précédent, nous nous sommes intéressés à la structure du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B et au mode de liaison de l'ifenprodil dans ce domaine. À présent que nous avons une connaissance plus précise du site de liaison de l'ifenprodil, nous avons voulu nous intéresser aux autres antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B. Comme il a été dit en introduction (Chapitre 4), de nombreux antagonistes des récepteurs NMDA, de structures chimiques variées, ont été développés par les compagnies pharmaceutiques (Chenard and Menniti, 1999; Nikam and Meltzer, 2002; McCauley, 2005; Layton et al., 2006; Borza and Domany, 2006; Mony et al., 2009a). Ces antagonistes ont montré des effets neuroprotecteurs *in vitro* et *in vivo* (Kemp and McKernan, 2002; Chazot, 2004; Muir, 2006), mais aucun d'entre eux n'a pu donner lieu à un médicament, notamment à cause de problèmes de biodisponibillité orale et de pharmacocinétique (Kew and Kemp, 2005). Dans le cadre de cette problématique, nous avons voulu rechercher de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA, si possible avec des structures chimiques originales. Pour ce faire, nous avons utilisé la technique du criblage virtuel (ou criblage *in silico*).

Cette technique permet, à partir d'informations sur la structure d'un récepteur ou sur ses ligands, de trouver, des composés actifs dans une base de données de molécules. Ce travail est présenté sous forme d'article dans la section suivante. Dans cette section, je vais présenter les différentes méthodes de criblage virtuel et, plus précisément, la méthode que j'ai utilisée pour rechercher de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA, à savoir le criblage virtuel sur la base d'un modèle de pharmacophore.

6.1.1 La technique du criblage virtuel

On désigne généralement par le terme "criblage virtuel" l'analyse, par des méthodes informatiques (*in silico*), de bases de données de molécules permettant d'identifier d'éventuels ligands d'une cible biologique donnée (Manly et al., 2001).

Dans la suite de cette étude, nous allons nous intéresser aux méthodes d'analyse *in silico* de bases de données d'un très grand nombre de molécules (plusieurs centaines de miliers à plusieurs millions de composés). On parle alors de criblage virtuel à haut débit (vHTS). La détection *in silico* de composés actifs, au sein d'une collection de molécules, est permise par deux types d'informations : la structure tridimensionnelle de la cible (approche "structure-based") ou les propriétés de ligands déjà connus de cette cible (approche "ligand-based").

Criblage virtuel exploitant la structure de la cible ("docking")

Cette méthode de criblage virtuel consiste à se servir de la structure tridimensionnelle de la cible considérée (structure obtenue par cristallographie aux rayons X, RMN, ou par modélisation par homologie) pour sélectionner, au sein d'une collection de molécules, les composés potentiellement actifs sur une cible donnée. Les différentes molécules sont ancrées ("docking") dans le site de liaison de la cible et la qualité de l'interaction entre une molécule et le récepteur est évaluée grâce à une fonction de score ("scoring"). Afin d'assurer des vitesses de criblage importantes (de l'ordre de 10 à 30 s par molécule), la structure du récepteur est généralement gardée fixe et les différentes conformations des

ligands sont calculées de façon automatisée.

Cette technique est très puissante et possède de nombreux avantages (Good et al., 2000). Tout d'abord, une fois la poche de liaison déterminée, cette méthode n'impose pas, *a priori*, un mode de liaison précis aux molécules criblées, ce qui permet de trouver des molécules adoptant des modes de liaison légèrement différents au sein de la poche de liaison. De plus, cette technique ne prenant pas en compte les ligands déjà connus de la cible (voir paragraphe suivant), elle n'introduit aucun biais quant à la structure chimique des molécules potentiellement actives. Pour les deux raisons évoquées, le criblage virtuel "structural" est la méthode permettant le mieux de découvrir de nouvelles classes chimiques de ligands (Walters et al., 1998).

Cependant, cette méthode présente certains inconvénients. Le premier est qu'elle nécessite une structure à haute résolution, obtenue par cristallographie aux rayons X ou pas RMN, du récepteur d'intérêt. Or une telle structure n'est pas forcément disponible. De plus, cette technique est gourmande en temps de calcul, car chaque molécule doit être individuellement ajustée dans le site de liaison et son interaction avec la protéine notée grâce à une fonction de score. Enfin, la protéine étant généralement gardée fixe pendant le criblage, la position des chaînes latérales des résidus formant la poche de liaison a une importance capitale. Il est ainsi souvent nécessaire d'utiliser des structures du récepteur d'intérêt cristallisées en présence d'un ligand. Cependant, des criblages virtuels structuraux ont déjà été réalisés avec succès à partir de modèles par homologie en compensant la rigidité du récepteur par la génération de conformations distinctes de ce récepteur (Triballeau et al., 2005).

Criblage virtuel s'appuyant sur les ligands

Cette méthode de criblage virtuel s'appuie sur la structure chimique de ligands déjà connus de la cible considérée pour en détecter de nouveaux au sein d'une base de données de molécules. Une méthode de criblage virtuel s'appuyant sur les ligands ("ligand-based")

repose sur la construction d'un modèle de pharmacophore (voir ci-dessous).

La réalisation d'un criblage virtuel sur la base des ligands ne nécessite pas de connaître une structure à haute résolution de la cible, qui est dans certains cas difficile à obtenir. De plus, les temps de calculs nécessaires sont généralement moins importants que pour le criblage virtuel par ancrage moléculaire, les paramètres décrivant les éléments structuraux des ligands étant plus simples et moins nombreux que ceux décrivant le site de liaison d'un ligand au sein d'une protéine. Cependant, le criblage virtuel s'appuyant sur les ligands permet moins bien de trouver des molécules de structures chimiques complètement originales, étant plus ou moins biaisé par les structures chimiques des ligands déjà connus. De plus, dans le cas de l'approche par pharmacophore, il est supposé que des ligands ayant des structures similaires adoptent des modes de liaison similaires, ce qui n'est pas toujours le cas.

Dans le cas de notre étude, nous nous situons en aval d'une énorme campagne de recherche de composés inhibant sélectivement les récepteurs contenant la sous-unité GluN2B. Depuis la découverte en 1988 de l'ifenprodil comme antagoniste des récepteurs NMDA (Carter et al., 1988), quelques milliers d'analogues ont été développés par les différentes sociétés pharmaceutiques. Ainsi, en recherchant les analogues d'ifenprodil dans la littérature (articles et revues publiés entre 1997 et 2009, sans prendre en compte les brevets), j'ai pu répertorier 575 composés dont l'activité sur les récepteurs NMDA a été mesurée. Nous possédons par conséquent une énorme quantité d'informations sur les ligands des récepteurs NMDA spécifiques de la sous-unité NR2B. Par contre les informations sur la structure de la cible, le domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B, sont plus vagues. En effet, à l'époque où nous avons commencé le projet, aucune structure cristallographique de domaine N-terminal de récepteur NMDA n'avait été résolue. Une structure du NTD de GluN2B liant l'ifenprodil a été proposée dans mon article précédent par homologie avec le domaine de liaison du glutamate du récepteur métabotropique mGluR1 (Mony et al., 2009b). Cependant, mGluR1 et le NTD de GluN2B ne partageant que 12 % d'identité

de séquence, le modèle par homologie du NTD de GluN2B n'était pas assez précis pour réaliser un criblage virtuel "structural". Nous avons par conséquent exploité la manne d'informations concernant les relations entre structure et activité des ligands du NTD de GluN2B pour réaliser un criblage virtuel sur la base d'un modèle de pharmacophore.

6.1.2 Mise au point d'un criblage virtuel sur la base d'un modèle de pharmacophore

Par définition, un pharmacophore représente "l'ensemble des caractères stériques et électroniques nécessaires à assurer des interactions supramoléculaires optimales avec une cible biologique spécifique et provoquer (ou empêcher) une réponse biologique" (Wermuth et al., 1998). Le modèle de pharmacophore vise donc à récapituler les interactions que font un ensemble de ligands sur une cible biologique afin d'en expliquer l'activité. Il peut-être fondé sur les propriétés chimiques des ligands ou bien sur celles de la poche de liaison au sein du récepteur, mais nous allons nous intéresser aux pharmacophores fondés sur ligands.

Dans un pharmacophore, les interactions électroniques entre le ligand et le récepteur sont symbolisées par des "caractères" (ou "features"), qui représentent des classes de groupements chimiques exerçant différents types d'interactions non covalentes (groupements hydrophobe, donneur de liaison hydrogène, chargé positivement, etc...). La FIGURE 6.1 représente ainsi deux exemples de pharmacophores (à deux et trois dimensions) rendant compte de l'activité des antagonistes des récepteurs NMDA se liant sélectivement sur la sous-unité GluN2B. Ces pharmacophores ont en commun quatre caractères : un caractère "positif ionisable" central (groupement positivement chargé à pH physiologique), deux caractères "hydrophobe" et un caractère "donneur de liaison hydrogène". Les interactions stériques avec le récepteur peuvent aussi être prises en compte, soit par l'introduction de sphères d'exclusion, qui définissent un volume où le ligand ne peut pas se placer, soit par l'introduction de l'enveloppe d'une molécule active (voir FIGURE 6.1B), qui définit le volume de Van der Waals occupé par cette molécule ("shape"). Pour être considérés actifs,

les autres composés ne doivent alors pas dépasser de l'enveloppe.

Si les modèles de pharmacophore à deux dimensions, tels que représentés dans la FIGURE 6.1A, sont souvent réalisables à la main grâce à l'analyse visuelle d'études de relations structure-activité, la construction de modèles de pharmacophore à trois dimensions nécessite l'utilisation de procédés informatiques. Durant ma thèse, j'ai réalisé mes modèles de pharmacophore grâce au logiciel Discovery Studio version 2.0 (Catalyst, Accelrys, San Diego CA). Dans la suite de cette partie, je vais décrire les modes de construction et d'évaluation d'un modèle de pharmacophore tridimensionnel, tels que je les ai utilisés dans ma thèse.

Construction du modèle de pharmacophore

Il existe différents types de modèles de pharmacophore, selon l'information que l'on désire obtenir :

- Les modèles de pharmacophore qualitatifs, qui décrivent l'organisation des caractères communs aux molécules actives. Ce type de pharmacophore nous informe sur les critères que doit remplir une molécule pour être active sur une cible donnée. Le pharmacophore à deux dimensions décrit dans la FIGURE 6.1A en est un exemple. C'est aussi ce type de modèle que nous avons utilisé lors de la réalisation du modèle de liaison de l'ifenprodil dans le NTD de GluN2B (Mony et al., 2009b), afin de valider la conformation de l'ifenprodil dans son site de liaison. Le modèle a été généré grâce au module HipHop de Catalyst.
- Les modèles de pharmacophore quantitatifs, qui permettent d'expliquer et estimer l'activité d'une molécule donnée (générés, dans Catalyst, grâce au module Hypogen). Le pharmacophore, représenté dans la FIGURE 6.1B en est un exemple. Pour réaliser ce type de modèle de pharmacophore, il est nécessaire de posséder des informations à la fois sur des molécules actives et inactives sur la cible considérée.

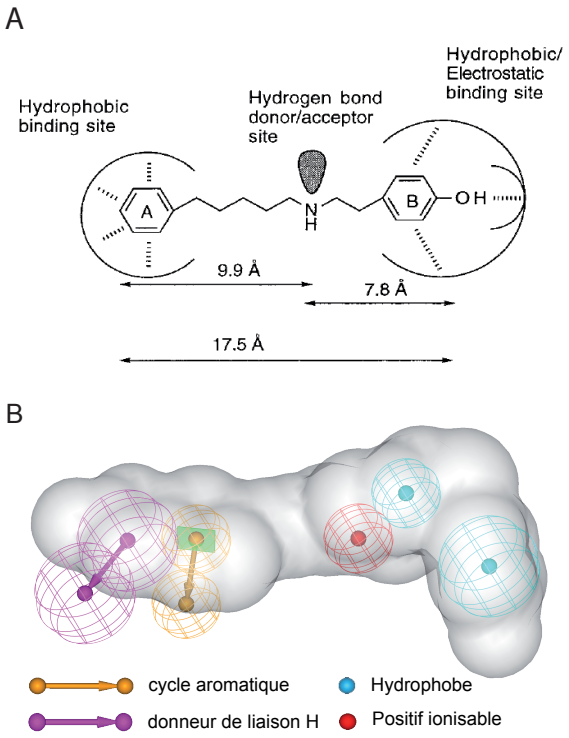


FIGURE 6.1 – Pharmacophores relatifs aux antagonistes spécifiques de la sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA. A. Pharmacophore à deux dimensions (Tamiz et al., 1998) résumant les principales interactions nécessaires à l'activité des analogues de l'ifenprodil. B. Modèle de pharmacophore quantitatif à trois dimensions comportant l'enveloppe de la molécule la plus active du "traininng set" ayant servi à construire le modèle. C'est ce modèle qui a été utilisé dans l'article III, pour le criblage virtuel de la base de données IBS. Les sphères représentent la tolérance géométrique sur chacun des caractères.

Les deux types de modèles de pharmacophore, qualitatifs et quantitatifs, peuvent être utilisés pour réaliser un criblage virtuel. Ainsi, Gitto et al. (2008) ont découvert des antagonistes des récepteurs NMDA se liant sur la sous-unité GluN2B en criblant la base de donnée CAP (Compounds Available for Purchase, Accelrys) sur la base d'un pharmacophore qualitatif. Comme nous disposions d'une grande quantité de données de relations structure-activité sur les antagonistes sélectifs de GluN2B et qu'en particulier nous disposions de données à la fois sur des molécules actives et inactives, nous avons préféré utiliser un modèle de pharmacophore quantitatif pour réaliser le criblage de la base de données IBS. La construction d'un modèle de pharmacophore quantitatif de type "Hypogen" se fait selon le protocole décrit ci-dessous.

La construction d'un pharmacophore quantitatif nécessite au préalable la sélection minutieuse de composés dont l'activité sur la cible considérée est connue. C'est cette sélection, appelée "training set", qui est utilisée pour construire un modèle de pharmacophore. Pour optimiser les capacités de prédiction d'activité d'un modèle de pharmacophore quantitatif, le "training set" doit comporter au moins 15 molécules dont l'activité s'étend, idéalement, sur au moins 4 unités log d'activité. Chaque unité log d'activité doit être représentée par au moins trois composés de structures les plus diverses possibles (Kurogi and Guner, 2001). Pour réaliser le "training set" relatif aux antagonistes des récepteurs NMDA se liant sélectivement sur la sous-unité GluN2B, nous avons choisi trois à quatre molécules par unité log d'activité, pour un total de 16 molécules (voir la Table 1 et la Figure 1 de l'article III). Les activités (sous forme d'IC_{50} normalisées par rapport à celle de l'ifenprodil, voir article III) varient de 0.03 à 560, respectant donc bien la différence d'au moins quatre unités log entre la plus active et la moins active. Ensuite, différents conformères sont générés pour chaque molécule du "training set".

Une fois le "training set" défini, la construction, avec le module Hypogen, d'un modèle de pharmacophore quantitatif se fait en trois étapes (Kurogi and Guner, 2001).

1. **Phase constructive :** Cette phase permet d'identifier des hypothèses (modèles

de pharmacophores) communes à l'ensemble des molécules "actives". Sont définies comme molécules "actives" celles dont l'activité est strictement située dans l'intervalle d'erreur de la molécule la plus active. Dans le cas de notre étude, où on a défini l'erreur sur l'activité expérimentale à une unité log d'activité, sont considérées comme actives les molécules **5** à **7** du "training set". Le logiciel énumère toutes les hypothèses possibles sur lesquelles les molécules "actives" peuvent s'ajuster.

2. **Phase soustractive :** Pendant cette phase, les hypothèses générées pendant la phase constructive sur lesquelles les molécules "inactives" s'ajustent correctement sont éliminées. Sont considérées comme "inactives" les molécules dont l'activité répond à l'équation suivante :

$$\log \text{composé X} - \log \text{composé le plus actif} > 3.5$$

On comprend ainsi la nécessité d'avoir, dans le "training set", des molécules dont l'activité s'étale sur quatre unités log. Dans le "training set" que nous avons utilisé dans l'article 3, sont considérées comme inactives les molécules **17** à **20**.

3. **Phase d'optimisation :** Cette phase permet l'amélioration des hypothèses retenues à l'issue de la phase soustractive en leur appliquant de légères perturbations, de façon à optimiser la prédiction d'activité des molécules du "training set". Les différentes molécules sont ajustées sur chaque hypothèse et la qualité de l'ajustement géométrique de chaque molécule par rapport aux différents caractères de l'hypothèse est évaluée grâce à une valeur appelée "fit value". Sur la FIGURE 6.2, on peut voir par exemple que, pour la molécule **5**, chaque groupement chimique caractéristique de la molécule s'ajuste parfaitement avec le centre de chaque caractère. Cette molécule a une valeur d'ajustement importante (fit value = 10.64). Ce n'est pas le cas de la molécule **14** qui n'a pu être ajustée avec les caractères "cycle aromatique" et "donneur de liaison hydrogène" et qui a donc une valeur d'ajustement beaucoup plus faible (fit value = 6.38). L'activité prédite d'une molécule est une fonction affine des "fits values". Finalement, les différentes hypothèses sont classées par fonction de

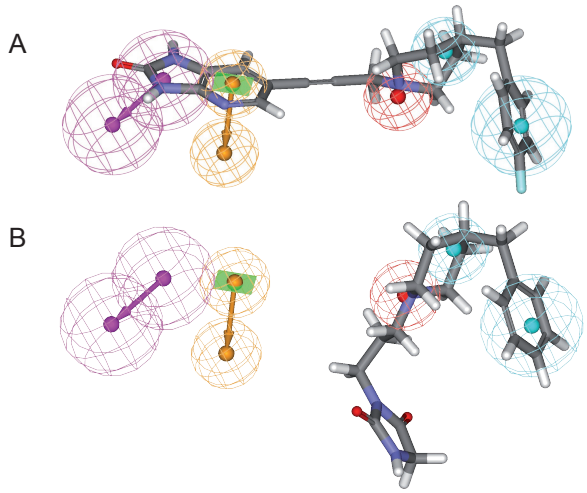


FIGURE 6.2 – Exemples des molécules **5** (A) et **14** (B) du "training set" ajustées dans le modèle de pharmacophore retenu dans l'article 3. Les réprésentations des caractères sont les mêmes que dans la FIGURE 6.1B. Les molécules sont représentées sous forme de bâtons, les atomes étant colorés de façon conventionnelle (voir Annexe)

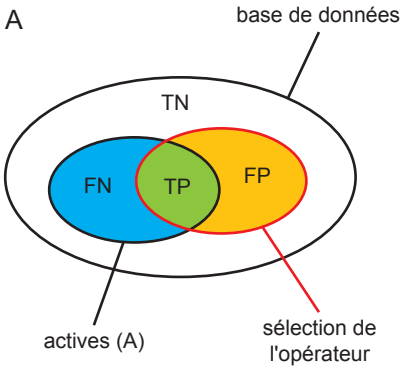
score croissante. Le score est exprimé sous la forme d'un coût, qui prend en compte l'erreur sur les estimations des activités et la complexité du pharmacophore. La capacité de chaque hypothèse à prédire l'activité d'une molécule donnée est évaluée grâce au coefficient de corrélation entre les activités expérimentales et les activités prédites (r^2) et grâce au RMS (root mean square) qui donne une indication sur les erreurs de prédiction du modèle. On considère généralement qu'un modèle correct doit avoir au moins un $r^2 > 0,8$ et un RMS $< 1,5$.

Les paramètres d'évaluation d'un modèle de pharmacophore (coût, coefficient de corrélation, RMS), calculés et optimisés pour un petit nombre de molécules, ne suffisent pas à valider le fait que ce modèle est capable de prédire l'activité de molécules autres que celles du "training set". Une fois le modèle de pharmacophore choisi, il est nécessaire d'en effectuer une validation ultérieure en utilisant une collection de molécules différentes de celles du "training set", et d'activités expérimentales connues. Cette collection de molécules est appelée "test set". Dans le cas de notre étude, nous avons utilisé un "test set" de 162

molécules d'activité connue et de structure similaire à celle de l'ifenprodil. Les résultats obtenus à partir du "test-set" ont été analysés grâce à la méthode des courbes ROC.

Validation du modèle de pharmacophore : les courbes ROC

Pour qu'un modèle de pharmacophore puisse être utilisé pour réaliser un criblage virtuel, il doit permettre l'identification d'un maximum de molécules expérimentalement actives (vrais positifs) et éviter de détecter des molécules qui ne le sont pas (faux positifs). Ces caractéristiques peuvent être évaluées grâce à la génération de courbes ROC (Receiver Operating Characteristics). Les courbes ROC sont couramment utilisées dans des domaines aussi variés que la médecine, la météorologie ou la criminologie comme outils d'aide à la décision. Elles ont été plus récemment introduites dans le domaine de la chimie médicinale afin de répondre à la question « Est-ce que le modèle que j'ai choisi est capable de distinguer les molécules actives de celles inactives ? » (Triballeau et al., 2005, 2006).



B

	In vitro	
In silico	Actives	Inactives
Sélectionnées	vrais positifs (TP)	Faux positifs (FP)
Rejetées	Faux négatifs (FN)	Vrais négatifs (TN)
	Se = TP / (TP+FN)	Sp = TN / (TN+FP)

FIGURE 6.3 – Différentes catégories de molécules au sein d'une base de données. D'après Triballeau et al. (2006). A, L'ensemble des molécules sélectionnées par l'opérateur est représenté par un ovale rouge. A, actives ; FN, faux négatifs ; FP, faux positifs ; TN, vrais ("true") négatifs ; TP, vrais ("true") positifs. B, Matrice de confusion représentant les dénominations des différentes catégories de molécules en fonction de leur activité prédite *in silico* et de leur activité expérimentale (*in vitro*)

L'étude du test-set permet de déterminer la stratégie à adopter lors du criblage virtuel d'une base de données. Prenons encore l'exemple du criblage virtuel que nous avons réalisé sur les antagonistes des récepteurs NMDA. Les différents conformères du "test set" d'analogues d'ifenprodil ont été ajustés sur le modèle de pharmacophore représenté

en FIGURE 6.2. Une valeur d'ajustement est alors attribuée à chaque molécule. La FIGURE 6.4A repésente la distribution des molécules actives et inactives en fonction de leur "fit value". Ici on a considéré comme expérimentalement actives les molécules ayant une activité inférieure à deux fois celle de l'ifenprodil ($IC_{50} < 2 \times IC_{50}$(ifenprodil)). A partir de ces deux distributions, l'opérateur peut définir une valeur seuil Si de "fit value" en dessous de laquelle il ne retiendra pas les composés, car considérés inactifs. Dans notre cas, on remarque que les distributions des molécules expérimentalement actives (A) et inactives (N pour négatives) se superposent (FIGURE 6.4A), ce qui signifie que, quelle que soit la valeur de seuil choisie, il y aura une proportion de molécules inactives dans les molécules retenues par l'opérateur, et une proportion de molécules actives dans les molécules écartées. Les molécules inactives sélectionnées par l'opérateur sont appelées "faux positifs" (FP), par opposition aux molécules sélectionnées par l'opérateur qui sont réellement (expérimentalement) actives (TP pour "True Positives") (FIGURE 6.3). À l'inverse, les molécules expérimentalement actives non retenues par l'opérateur sont appelées "faux négatif" (FN) par opposition aux molécules véritablement (expérimentalement) inactives (TN pour "true negative")(FIGURE 6.3). Pour un seuil Si donné, à partir des nombres de molécules A, N, TN, TP, FN et FP, on peut calculer deux grandeurs, la sélectivité (Se) et la spécificité (Sp), qui sont définies de la façon suivante :

$$\mathrm{Se} = \frac{\mathrm{TP}}{\mathrm{A}} = \frac{\mathrm{TP}}{\mathrm{TP+FN}} \text{ et } \mathrm{Sp} = \frac{\mathrm{TN}}{\mathrm{N-A}} = \frac{\mathrm{TN}}{\mathrm{TN+FP}}$$

Les courbes ROC représentent, pour chaque valeur de seuil Si, la sélectivité "Se" en fonction de "1 − Sp" (FIGURE 6.4B). "Se" représente la proportion de molécules expérimentalement actives détectées. "1 − Sp" correspond à la proportion de molécules expérimentalement inactives qui ont été sélectionnées par l'opérateur ("faux positifs"). "1 − Sp" représente donc en quelque sorte le "bruit de fond" du modèle. La capacité d'un modèle à discriminer, au sein d'une base de donnée, les molécules expérimentalement actives des molécules expérimentalement inactives peut être évaluée grâce au calcul de l'aire sous la courbe ROC (AUC pour "area under the curve"). Dans le cas d'un modèle

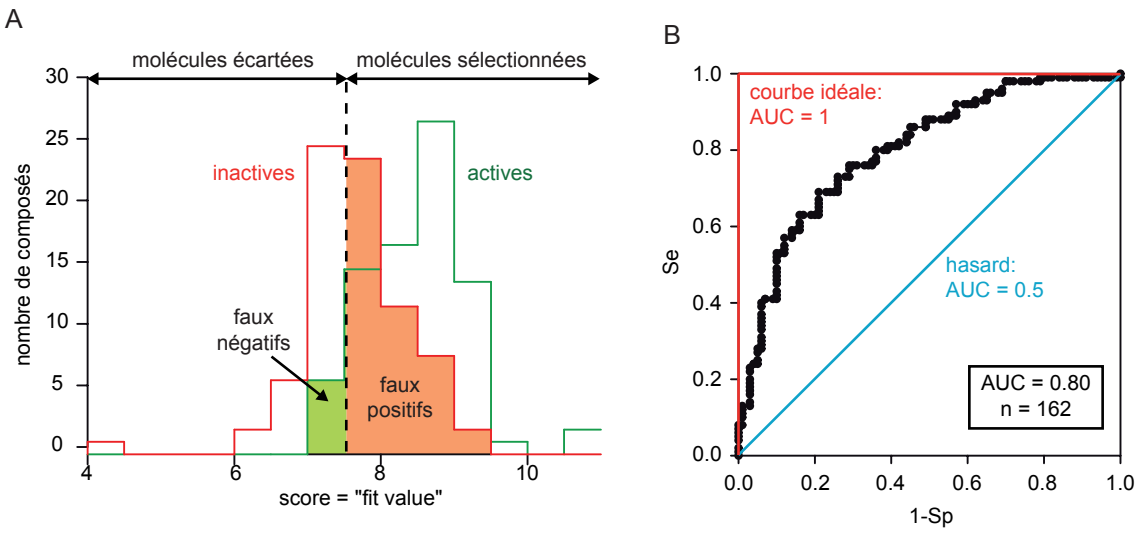


FIGURE 6.4 – Principe de la construction des courbes ROC. A. Distribution des molécules actives (courbe verte) et inactives (courbe rouge) du "test set" d'analogues d'ifenprodil en fonction de leur "fit value". La droite pointillée représente une valeur de seuil Si de "fit value" fixée par l'opérateur. L'ensemble des molécules "faux positifs" est colorié en saumon, celui des molécules "faux négatifs" est colorié en vert. B. Courbe ROC découlant de la distribution représentée en A. Chaque point représente la sélectivité (Se) en fonction du "bruit de fond" $(1 - \mathrm{Sp})$ pour chaque valeur de seuil Si choisie.

de pharmacophore idéal, il existe un seuil Si pour lequel l'opérateur sélectionne la totalité des molécules expérimentalement actives ($\mathrm{Se} = 1$), sans sélectionner aucune molécule expérimentalement inactive ($1 - \mathrm{Sp} = 0$). Dans le cas d'un modèle idéal, l'aire sous la courbe est donc égale à 1 (FIGURE 6.4). Au contraire, si l'on imagine que les "fit values" des molécules sont attribuées au hasard, l'opérateur sélectionne autant de molécules expérimentalement actives que de molécules expérimentalement inactives. Ainsi, quelque soit le seuil Si, on a $\mathrm{Se} = 1 - \mathrm{Sp}$, d'où une aire sous la courbe égale à 0,5. Un modèle de pharmacophore est donc d'autant meilleur que son aire sous la courbe ROC est proche de 1.

6.1.3 Article III

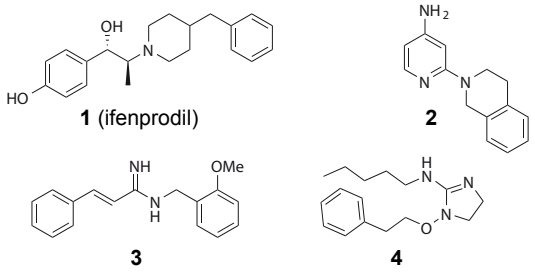
Identification of a novel GluN2B-selective NMDA receptor antagonist using a virtual screening approach

laetitia Mony, Nicolas Triballeau, Hughes Olivier-Bertrand, Pierre Paoletti and Francine Acher

NMDA receptors (NMDARs) form glutamate-gated ion channels highly permeable to calcium and widely distributed in the vertebrate central nervous system. They play major roles in physiological processes such as memory formation and synaptic plasticity but their overactivation, resulting in an excess of intracellular calcium, triggers neuronal injury and is involved in numerous pathologies such as stroke, epilepsy and chronic pain (Dingledine et al., 1999). NMDARs are tetrameric assemblies usually composed of two NR1 and two NR2 subunits, these latter occurring as four subtypes (NR2A-D) and conferring distinct biophysical and pharmacological properties (Paoletti and Neyton, 2007; Cull-Candy et al., 2001). The first compounds developed to encounter the deleterious effects of NMDAR overactivation, either competitive antagonists or pore (ion channel) blockers, while neuroprotective, failed in clinical trials because of unacceptable side effects (Kew and Kemp, 2005). More recently, a large family of compounds selectively inhibiting NMDARs containing the NR2B subunit was developed and, encouragingly, such compounds display a much improved side effect profile compared to first-generation broad-spectrum NMDAR antagonists (Kemp and McKernan, 2002; Gogas, 2006; Mony et al., 2009a). At the level of the receptor, NR2B-selective antagonists act as allosteric (non-competitive) inhibitors and their binding site has been mapped to the NR2B N-terminal domain (NTD), an extracellular clamshell-like domain preceding the glutamate-binding domain on the NR2B subunit (Perin-Dureau et al., 2002; Mony et al., 2009b; Malherbe et al., 2003; Wee et al., 2010; Williams, 1993). So far, however, none of these NR2B-selective antagonists have turned into approvable drugs, due to poor oral bioavailability and low pharmacokinetic profile (Kew and Kemp, 2005). Developing new NR2B-selective NMDARs with original chemical scaffolds is thus of interest.

Virtual high-throughput screening is a convenient approach to find original ligand structures among a chemical database (Triballeau et al., 2008). In this work, we built a pharmacophore model of NR2B-specific NMDAR antagonists that was suitable for ligand-based virtual screening. This allowed us to identify one compound with an original central

core, LSP10-0500 (see below), which acts as selective inhibitor of NMDARs containing the NR2B subunit. A structure-activity relationship (SAR) study around this compound is also described.



Compounds that selectively inhibit NR2B-containing receptors are diverse in their structural and chemical features, as exemplified by compounds **1**–**4** (McCauley, 2005; Layton et al., 2006; Borza and Domany, 2006; Nikam and Meltzer, 2002). There is therefore a good chance that different structural series adopt different binding modes or even interact with different binding pockets. We thus decided to build a quantitative pharmacophore model that was restricted to compounds with a structure similar to ifenprodil (**1**), the prototypical NR2B-selective antagonist, for which we can reasonably assume a common binding mode (Malherbe et al., 2003; Wee et al., 2010). Such compounds share the following chemical features (Tamiz et al., 1998): one central positively charged group, one H-bond donor and two aromatic cycles. Biological activities of "ifenprodil-like" compounds in the literature are either IC_{50}, or inhibition constants (Ki) that have been determined by different means (electrophysiology, [^{3}H]ifenprodil or [^{3}H]Ro 25-6981 displacement). In order to work with a consistent dataset, we normalised all activities to that of ifenprodil (IC_{50} = 0.1 μM; Perin-Dureau et al., 2002; Tamiz et al., 1998; Buttelmann et al., 2003; Coughenour and Cordon, 1997) (Table 6.1).

The pharmacophore modelling calculations were carried out in the Discovery Studio 2.0 environment (Accelrys, San Diego CA). We first selected from the literature a training set of 16 compounds (Figure 6.5) with normalised activities ranging from 0.03 to 560

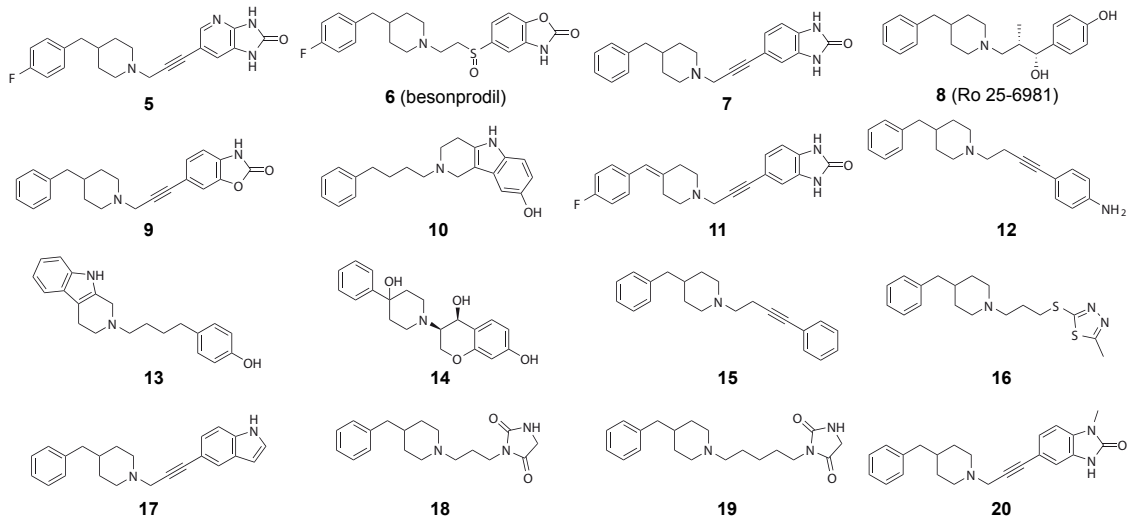


Figure 6.5 – Chemical structures of the NR2B-specific NMDAR antagonists used in the training set.

(Table 6.1). The error of the experimental values was set to one log of activity. The conformational enumeration of the training set was performed in Discovery Studio using the "Best" algorithm of Catalyst/Catconf (Energy range of 20 kcal.mol^{-1} and maximum number of conformers of 250; Smellie et al., 1995). We then used Catalyst/Hypogen (Li et al., 2000) to build a quantitative pharmacophore model of NR2B-selective, "ifenprodil-like", NMDAR antagonists. The minimum distance between two features was set to 2 Å, and the weight and the tolerance of each feature were allowed to vary. We chose a pharmacophore model that contained the following five features: two hydrophobic, one ring aromatic, one positive ionisable and one H-bond donor (Figure 6.6A). As expected, the nature of the features was in agreement with previously described qualitative pharmacophores (Tamiz et al., 1998; Kornberg et al., 2004; Mony et al., 2009b). Although the activities of only half of the molecules in the training set were correctly predicted by the model (Table 6.1), our pharmacophore model had acceptable statistical parameters for virtual screening purposes, with a correlation coefficient (r^2) between "estimated" and "experimental" activities of 0.90 and a RMSD (root mean square deviation) value of 1.32.

To be suitable for virtual screening, a pharmacophore model must lead to the iden-

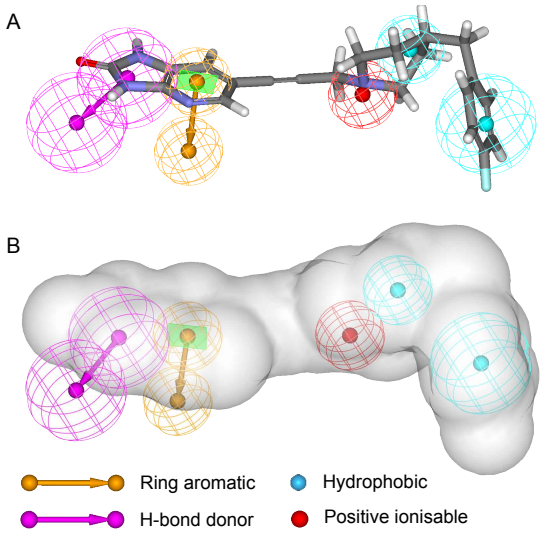


Figure 6.6 – Pharmacophore model of NR2B-specific, "ifenprodil-like", NMDAR antagonists. A, Pharmacophore model with molecule 5 fitted into it. The spheres represent the tolerances of the features. B, Pharmacophore model with the shape of molecule 5. The shape represents the Van-der-Waals volume occupied by a molecule.

tification of the maximum of true positive, *i.e.* experimentally active molecules, while avoiding the identification of false positive compounds. Accordingly, to test the quality of our pharmacophore model, we performed a ROC (receiver operating characteristics) curve analysis (Triballeau et al., 2005, 2006) of a test-set of 162 molecules of known experimental activity. The 162 molecules were mapped onto the pharmacophore model, and a score, called fit value, was attributed to each molecule depending on the best geometric fit of the molecule with the pharmacophore model. Compounds were then ranked according to their fit values. A ROC curve represents, for each threshold of fit value, the selectivity (Se), *i.e.* the proportion of true positive compounds, as a function of 1-Sp (specificity), *i.e.* the proportion of false positive compounds. Calculation of the area under the curve (AUC) gives a good indication of the discriminatory quality of the pharmacophore model (Triballeau et al., 2006, 2005). Indeed, an ideal pharmacophore model would lead to the identification of all and only true positive hits, thus leading to an AUC of 1. On the contrary, attributing molecule scores randomly would lead to an AUC of 0.5. In our case, we

found an AUC of 0.80 (Figure 6.7), indicating that the retained pharmacophore model is specific enough to perform a virtual screening campaign.

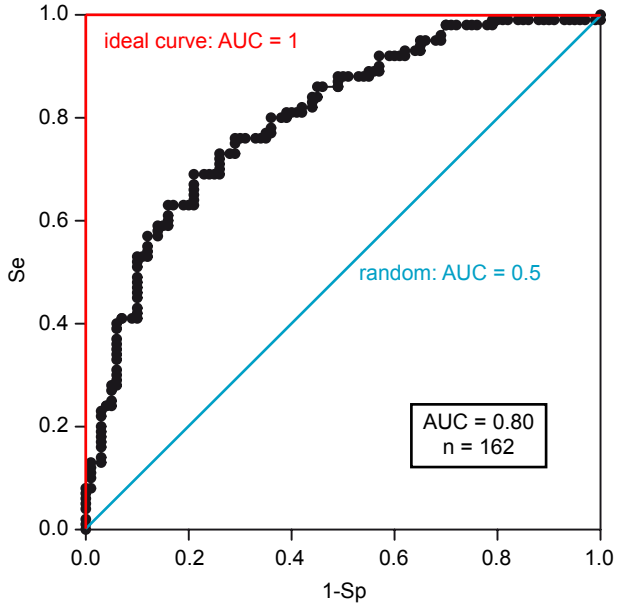


Figure 6.7 – ROC curve analysis of the pharmacophore model of NR2B-specific NMDAR antagonists. The random curve, where a score is randomly attributed to each molecule, is represented in blue. The ideal curve is represented in red. Se (sensitivity) represents the ability of the model to select truly active molecules; Sp (specificity) represents the ability of the model to discard inactive molecules. AUC = area under the curve; n = number of molecules in the test set used to perform the ROC curve analysis.

We next exploited our pharmacophore model to screen the commercial database of Interbioscreen Ltd (IBS STOCK, synthetic compounds, March 2007; Moscow, Russia) for new NR2B-selective NMDAR antagonists. Figure 6.8 summarizes the strategy used to screen this database and to filter the results. The chosen IBS database contains 403,273 compounds. As our pharmacophore model contains a "positive ionisable" feature, a feature which is less frequently found in "drug-like" chemical compounds than hydrophobic or H-bond donor and acceptor features (Triballeau et al., 2006), we first screened the IBS database with a single "positive ionisable" criterion to decrease the number of candidates. The resulting 82,302 molecules (bearing a "positive ionisable" group) were then adjusted to the pharmacophore model, and 754 molecules were retained. To further refine

the retrieved compounds, we finally applied a steric filter to our set of molecules. For that purpose, the shape of the experimentally most active molecule of the training set (molecule **5**; Figure 6.6B), defined as the Van der Waals volume occupied by this bioactive conformation, was taken into account, in order to discard compounds that are too large to fit in the ifenprodil binding site. Of the 754 compounds adjusted to the combination of pharmacophore model and shape, 58 molecules satisfied both the pharmacophoric and steric criteria. These molecules were then regrouped by structural similarity and 10 compounds, named LSP10-0100 to LSP10-1000, were purchased for functional studies (see Table 6.2).

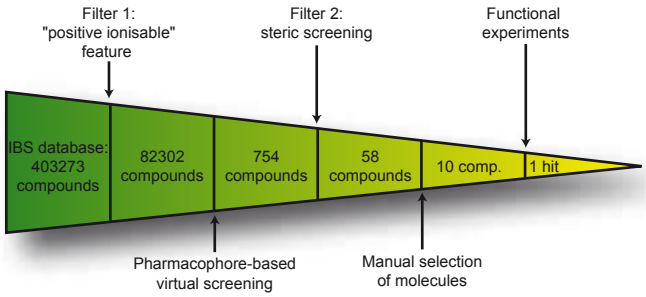


Figure 6.8 – Summary of the virtual screening workflow.

Functional activities of the selected compounds were determined by two-electrode voltage-clamp recordings on Xenopus oocytes expressing wild-type NR1/NR2B receptors (Mony et al., 2009b). NMDA currents were induced by saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100 μM each), and the effects of the different compounds were assessed by measuring the change in current size induced by the application of 10 μM of the compound during an NMDA response. Application of 10 μM LSP10-0100 to LSP10-0400 or LSP10-0600 to LSP10-1000 induced little ($< 20\,\%$) inhibition of NR1/NR2B receptors. In contrast 10 μM LSP10-0500 strongly inhibited NR1/NR2B receptors ($78 \pm 5\,\%$ inhibition, $n = 6$–12; Table 6.2). To verify that the inhibitory effect seen with LSP10-0500 was specific for the NR2B subunit and, like ifenprodil, engaged the NR2B NTD, we tested the effects of LSP10-0500 on NR1/NR2A receptors and on NR1/NR2B receptors

truncated for the entire NR2B NTD (NR1/NR2B-ΔNTD; Rachline et al., 2005). Both receptor subtypes were almost completely insensitive to LSP10-0500 (4–6 % inhibition; Table 6.2), indicating that this compound, like ifenprodil, selectively inhibits NMDARs containing the NR2B subunit and most likely binds to NR2B NTD. Similarly to ifenprodil, LSP10-0500 contains two aromatic cycles, one benzyl (called ring A, see Figure 6.9) and one phenol group (called ring B). However its central core, composed of the association of a piperazine and a thiazolone moiety, is original compared to all the previously published NR2B-specific antagonists.

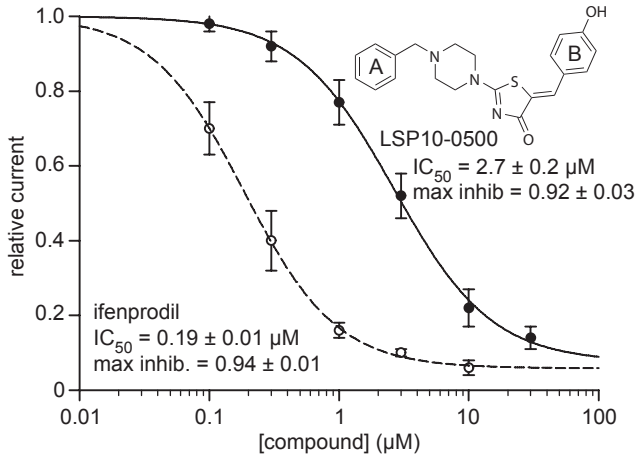


Figure 6.9 – Dose-response curves of LSP10-0500 and ifenprodil on wild-type NR1/NR2B receptors. Each point is the mean value obtained from three independent experiments. Error bars represent standard deviation. Dose-response curves were fitted according to the Hill equation : $I_{compound}/I_{control} = 1 - a/(1 + (IC_{50}/[compound])^n$, where $I_{compound}/I_{control}$ is the mean relative current, [compound] is the concentration of the considered compound, IC_{50} is the concentration of compound producing 50 % of the maximal inhibition, n is the Hill coefficient and a is the maximal inhibition at saturating compound concentration. The IC_{50}, maximal inhibition and Hill coefficient are, respectively, $0.19 \pm 0.01 \mu$M, 0.94 ± 0.01 and 1.22 ± 0.05 for ifenprodil, and $2.7 \pm 0.2 \mu$M, 0.92 ± 0.03 and 1.1 ± 0.1 for LSP10-0500.

LSP10-0500 inhibited wild-type NR1/NR2B receptors with an IC_{50} of $2.7 \pm 0.2\,\mu$M, a value ∼10-fold higher than that of ifenprodil ($IC_{50} = 0.19 \pm 0.01\,\mu$M in parallel experiments; Figure 6.9). Despite this lower potency, the original structure of LSP10-0500 renders this molecule a promising lead for the discovery of novel NR2B-selective NMDAR antagonists. To study the molecular determinants responsible for LSP10-0500 activity on

NR2B-containing NMDARs, and in an attempt to improve the activity of this compound, we performed a structure-activity relationship (SAR) study around LSP10-0500. Analogues of LSP10-0500 were pulled from two different databases, IBS and CAP (Chemicals Available for Purchase, Accelrys, San Diego CA, CAP reagents and CAP screening 2006), on the basis of the structure of the central core, *i.e.* the piperidine and thiazolone moieties. The retrieved compounds were then filtered against the shape of LSP10-0500 to remove the compounds that are too bulky. Next, using the C-DOCKER program (Wu et al., 2003), we docked 59 derivatives of LSP10-0500 in a homology model of NR2B NTD based on the crystallographic structure of the agonist-binding domain of mGluR1 (pdb: 1EWK:A; Mony et al., 2009b). It is worth noting that although a crystallographic structure of NR2B NTD was recently solved (Karakas et al., 2009, pdb: 3JPW), we were able to use it neither for ifenprodil, nor for any derivative of LSP10-0500, due to a lack of space in the (closed) interlobe cleft. The NR2B NTD, upon binding of ifenprodil, may thus adopt a degree of closure that is different from the zinc-bound NR2B NTD. Based on our docking, LSP10-0500 adopted a similar binding mode as ifenprodil, with its phenol group (ring B) contacting polar residues lining the border of the NTD cleft and its benzyl group (ring A) interacting more deeply with the hinge of the NTD (see Mony et al. (2009b)). We finally selected 13 compounds differing by three criteria: nature of the group connected to the piperazine moiety; nature of the substitutions of the aromatic cycles A and B; and configuration of the C-C double bond of the benzylidene moiety.

As predicted by our pharmacophore model, removal of the hydrogen-bond donor in derivatives of LSP10-0500 induced a loss in activity (LSP10-0503, Table 6.3). The same effect was seen when ring A was replaced by a methyl group (LSP10-0506), as previously demonstrated for other ifenprodil derivatives (Nikam and Meltzer, 2002). Moving the phenolic hydroxyl group from the para to the ortho position, in molecule LSP10-0501, also strongly decreased the activity for NR2B-containing NMDARs. On the contrary, compound LSP10-0502, which contained hydroxyl groups at both para and ortho positions

of ring B had a slightly increased activity compared to LSP10-0500, with an IC_{50} of $1.65 \pm 0.06\,\mu$M. Changing the configuration of the benzylidene moiety from Z to E hardly modified the activity, with compound LSP10-0504 inhibiting NR1/NR2B receptors with an IC_{50} of $1.8 \pm 0.1\,\mu$M. This phenotype was not expected, as modifying the configuration of the benzylidene double bond would change the orientation of ring B, leading to different interactions of LSP10-0500 and LSP10-0504 with the residues of their binding pocket. It is therefore possible that NR2B interlobe cleft can allow two different binding modes that lead to the same IC_{50}. LSP10-0502 and LSP10-0504 induced almost no inhibition on NMDARs containing NR2Awt and NR2B-ΔNTD subunits (maximum 6 % inhibition at a concentration of $10\,\mu$M), suggesting that these compounds, like LSP10-0500, selectively bind NR2B NTD. Adding on LSP10-0504 a methoxy group at the meta position of ring B decreased the activity five-fold (LSP10-0505, $IC_{50} = 11 \pm 4\,\mu$M; see Table 6.3), probably because of a steric hindrance between the –OMe group and residues located at the entrance of the NTD cleft.

We next investigated the activity of the phenyl-piperazinyl-thiazolone derivatives of LSP10-0500 (Table 6.4). These compounds, shorter and less flexible than LSP10-0500, were predicted by our pharmacophore and docking models to have some activity on NMDARs. Unfortunately, this series of compounds appeared poorly active. LSP10-507, the analogue of LSP10-500 but with a phenyl instead of a benzyl moiety, produced only 25 % inhibition when applied at a concentration of $10\,\mu$M (Table 6.4). Changing the configuration of the benzylidene group (LSP10-513) or adding a fluoride on ring A to increase the molecule length did not modify the activity of these compounds (see Table 6.4). Furthermore, adding bigger groups induced a complete loss of activity. Apart from the difference of length, the main difference between the benzyl and the phenyl derivatives resides in the flexibility of ring A, this aromatic ring being much less flexible in the phenyl derivatives due to a conjugation with a nitrogen of the piperazine group. Based on the docking of LSP10-0500, ring A would interact with the hinge region of NR2B NTD, a region likely

to be structurally constrained (Mony et al., 2009b). It is thus possible that the phenyl derivatives are not able to provoke the closure of NR2B NTD that induces inhibition of NMDARs (Karakas et al., 2009; Perin-Dureau et al., 2002).

In summary, using a virtual screening approach based on a quantitative pharmacophore model, we found a new molecule, the hit compound LSP10-0500, which selectively inhibits NMDARs containing the NR2B subunit. This compound is ten-fold less potent than ifenprodil, but its original central core makes of LSP10-0500 a promising starting point for the development of new NR2B-selective antagonists. The preliminary SAR around LSP10-0500 gives directions on where to conduct a subsequent optimisation. Replacing the benzyl group (ring A) of LSP10-0500 by a phenyl group strongly reduced compound activity. However, changing the configuration of the double bond of the benzylidene moiety (LSP10-0504), or adding a second hydroxyl group (LSP10-0502) slightly increases the potency on NR1/NR2B receptors. It would therefore be interesting to conduct new SAR studies on the basis of these latter compounds.

Table 6.1 – Experimental and estimated activities together with the error values of the training set compounds **5**–**20**.

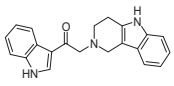
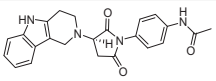
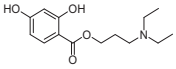
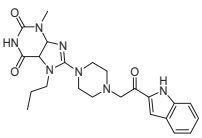
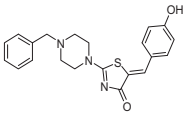
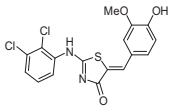
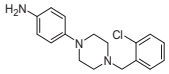
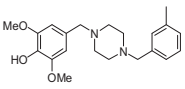
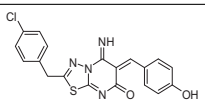
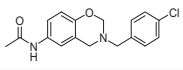
N°	Experimental activity[a]	Estimated activity[b]	Error[c]	Fit value	Reference
5	0.03	0.0087	-3.5	10.64	Kornberg et al., 2004
6	0.03	0.12	+4	9.50	Barta-Szalai et al., 2004
7	0.048	0.33	+6.8	9.06	Wright et al., 2000
8	0.3	0.29	-1	9.11	Fischer et al., 1997
9	0.45	1.9	+4.1	8.31	Wright et al., 2000
10	0.45	0.49	+1.1	8.89	Tamiz et al., 1999
11	2.5	4.1	+1.6	7.96	Kornberg et al., 2004
12	4	71	+18	6.73	Wright et al., 1999
13	5	2.8	-1.8	8.12	Tamiz et al., 1999
14	11	7.3	-1.5	7.71	Butler et al., 1998
15	43	180	+4.1	6.33	Wright et al., 1999
16	58	11	-5	7.52	Gregory et al., 2000
17	140	55	-2.5	6.84	Wright et al., 2000
18	250	160	-1.6	6.38	Schelkun et al., 2000
19	440	63	-7.1	6.78	Schelkun et al., 2000
20	560	49	-11	6.88	Wright et al., 2000

a. Experimental activity (IC_{50} or Ki values) normalised to the activity of ifenprodil ($IC_{50} = 0.1\,\mu M$; Tamiz et al. (1998); Perin-Dureau et al. (2002)).

b. Activity predicted by the pharmacophore model.

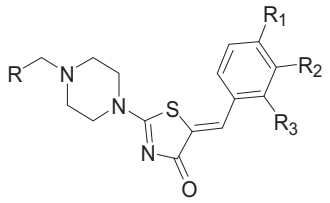
c. Error values are defined as the ratio between experimental and estimated activities. A negative value indicates that the experimental activity is higher than the predicted activity. The estimated activity is considered to be satisfactorily predicted by the model when the error is in the range of ± 3 compared to the experimental activity.

Table 6.2 – Inhibitory effect of compounds LSP 10-0100 to LSP 10-1000 (applied each at 10 μM) on NMDARs containing the NR1a and various NR2 subunits.

name	structure	residual current[a]		
		NR2B	NR2B-ΔNTD	NR2A
ifenprodil		0.06 ± 0.03	0.87 ± 0.01	0.77 ± 0.06
LSP10-0100		0.90	0.94	0.96
LSP10-0200		0.97	0.98	0.98
LSP10-0300		0.94	0.97	0.97
LSP10-0400		0.95 ± 0.01	0.97	0.98
LSP10-0500		0.22 ± 0.05	0.96 ± 0.02	0.94 ± 0.05
LSP10-0600		0.925 ± 0.005	0.96	0.97
LSP10-0700		0.98	0.98	0.97
LSP10-0800		0.96	0.97	0.98
LSP10-0900		0.90 ± 0.01	0.97	0.99
LSP10-1000		0.83 ± 0.01	0.88	0.77

a. The residual current is defined as the ratio of the current elicited by agonists plus 10 μM of compound on the current elicited by agonists alone. Each value is the mean value obtained from one to ten cells. Errors represent the standard deviations.

Table 6.3 – Structure-activity relationship study of IBS 5 derivatives: benzyl derivatives



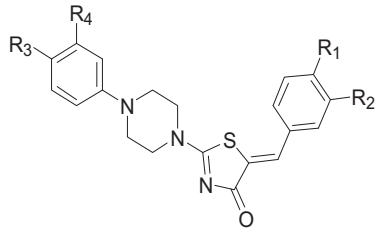
n° (LSP10-)	R	C=C config.[a]	R1	R2	R3	Residual current[b]			IC_{50} (μM)[c]
						NR2B	NR2B-ΔNTD	NR2Awt	
0500	Ph	Z	OH	H	H	0.22 ± 0.05	0.96 ± 0.02	0.94 ± 0.05	2.7 ± 0.2
0501	Ph	Z	H	H	OH	0.96 ± 0.01	0.96 ± 0.00	n.d.	n.d.
0502	Ph	Z	OH	H	OH	0.18 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.92 ± 0.03	1.65 ± 0.06
0503	Ph	Z	H	H	H	0.95 ± 0.01	0.97 ± 0.00	n.d.	n.d.
0504	Ph	E	OH	H	H	0.15 ± 0.01	0.96 ± 0.00	0.90 ± 0.04	1.8 ± 0.1
0505	Ph	E	OH	OMe	H	0.61 ± 0.04	0.97 ± 0.00	n.d.	11 ± 4
0506	Me	Z	OH	H	H	0.93 ± 0.02	0.96 ± 0.01	n.d.	n.d.

a. configuration of the C-C double bond of the benzilidene moiety.

b. Residual current after application of 10 μM compound. Each value is the mean value obtained from at least two cells.

c. Each values is the mean value obtained from at least three cells (n.d. = not determined). Errors represent the standard deviations.

Table 6.4 – Structure-activity relationship study of IBS 5 derivatives: phenyl derivatives



n° (LSP10-)	C=C config.[a]	R1	R2	R3	R4	Residual current[b]			IC_{50} (μM)[c]
						NR2B	NR2B-ΔNTD	NR2Awt	
0507	Z	OH	H	H	H	0.75 ± 0.06	0.89 ± 0.01	0.88 ± 0.04	n.d.
0508	Z	OH	H	F	H	0.75 ± 0.01	0.93 ± 0.01	n.d.	13 ± 6
0509	Z	OH	H	H	Cl	0.94 ± 0.03	0.95 ± 0.00	0.90 ± 0.04	n.d.
0510	Z	OH	OMe	Me	H	0.95 ± 0.03	0.98 ± 0.01	n.d.	n.d.
0511	Z	OH	OMe	H	Me	0.95 ± 0.03	0.98 ± 0.01	n.d.	n.d.
0512	Z	OH	OMe	Me	Cl	0.90 ± 0.02	0.98 ± 0.01	n.d.	n.d.
0513	E	OH	H	H	H	0.74 ± 0.01	0.95 ± 0.00	n.d.	n.d.

a. [,b,c]Same definitions as in Table 6.3

6.2 Discussion

Dans cet article, nous avons utilisé la technique du criblage virtuel pour rechercher, au sein de la base de données de molécules de la compagnie Interbioscreen Ltd (IBS), de nouveaux antagonistes se liant spécifiquement aux récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. En l'absence de structure à haute résolution du domaine N-terminal de la sous-unité GluN2B, nous avons décidé de réaliser ce criblage virtuel à partir d'un modèle de pharmacophore généré sur la base des ligands déjà connus des récepteurs GluN1/GluN2B.

Cette approche est actuellement largement utilisée (Manly et al., 2001; Kurogi and Guner, 2001; Triballeau et al., 2006) et avait déjà été appliquée avec succès au laboratoire sur les GCPR de la classe 3. Des criblages virtuels, soit à partir de la structure de la cible, soit sur la base des ligands ont en effet permis la découverte d'agonistes compétitifs du récepteur $mGlu_4$ (Triballeau et al., 2006) et du récepteur olfactif de poisson OR5.24 (Triballeau et al., 2008). Sur les récepteurs NMDA, par contre, cette technique a encore été très peu utilisée (du moins, il existe très peu d'études publiées de criblage virtuel sur les récepteurs NMDA). On recense deux études, la plus récente visant à comparer la capacité de différentes méthodes de criblage virtuel à détecter des antagonistes compétitifs originaux du site de liaison de la glycine (Krueger et al., 2009). Dans la deuxième étude, les auteurs ont recherché, par criblage virtuel de la base de données CAP ("chemicals available for purchase"), de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA sélectifs de la sous-unité GluN2B (Gitto et al., 2008). Notre démarche n'est donc pas complètement originale en ce qui concerne les recepteurs NMDA. Cependant, l'approche de Gitto et al. (2008) diffère sensiblement de la nôtre. En effet, les auteurs criblent la CAP à l'aide d'un modèle de pharmacophore qualitatif, généré uniquement à partir de molécules actives, alors que nous utilisons un modèle de pharmacophore quantitatif (voir Section 6.1.2). De plus, notre méthode d'évaluation et de sélection des modèles de pharmacophores par les courbes ROC, ainsi que notre stratégie de filtrage des composés issus du criblage sont originales par rapport à leur travail.

Pour réaliser ce criblage virtuel, nous voulions au départ prendre en compte l'ensemble de la diversité chimique des antagonistes des récepteurs NMDA GluN1/GluN2B, afin de maximiser les chances d'obtenir une structure originale. Parmi toutes ces molécules, les composés appartenant à la même série chimique que le composé **3** de l'article sont particulièrement intéressants car ils présentent une affinité environ cinquante fois plus importante que l'ifenprodil pour les récepteurs NMDA comportant la sous-unité GluN2B (Claiborne et al., 2003; Curtis et al., 2003; McCauley, 2005; Kiss et al., 2005). Cependant, nous n'avons pas pu générer de modèle de pharmacophore acceptable avec l'ensemble de ces structures chimiques. Cette impossibilité vient probablement du fait que les différentes séries chimiques des antagonistes des récepteurs GluN1/GluN2B adoptent des modes de liaison différents au sein du NTD de GluN2B. En effet, la génération d'un modèle de pharmacophore n'est valable que si les ligands adoptent le même mode de liaison au sein de la protéine (Triballeau et al., 2006). Nous avons donc choisi de générer des modèles de pharmacophores à partir de molécules de structure chimique similaire à l'ifenprodil, car c'est la série chimique la plus abondante et celle pour laquelle il existe le plus de données biologiques. Pour ces molécules, on peut faire la supposition qu'elles adoptent un mode de liaison commun. En effet, des études de mutagénèse dirigée visant à étudier les modes de liaison de Ro 25-6981 (molécule **7** de la FIGURE 4.4, page 4.4 ; Malherbe et al., 2003) ou du benzimidazole XK1 (McCauley et al., 2004; Wee et al., 2010) dans le NTD de GluN2B ont révélé que la plupart des résidus contrôlant la sensibilité à l'ifenprodil contrôlent aussi la sensibilité envers ces deux composés.

Tous les composés choisis dans le "training set" et le "test set" possèdent des caractéristiques communes : deux cycles aromatiques, une charge positive centrale et un groupement donneur de liaisons hydrogènes. De façon logique, on retrouve aussi ces caractères dans le modèle de pharmacophore quantitatif que nous avons sélectionné (FIGURE 6.6). C'est aussi le cas du modèle de pharmacophore utilisé par Gitto et al. (2008) qui comprend comme notre pharmacophore quantitatif, un caractère "positif ionisable", deux caractères

"hydrophobes" un caractère "hydrophobe aromatique" et un caractère "donneur de liaison hydrogène". Le pharmacophore qualitatif de Gitto et al. (2008) contient en plus un caractère "accepteur de liaison hydrogène". Cette différence entre les deux modèles de pharmacophore provient certainement du fait que Gitto et al. (2008) n'ont pris en compte que des molécules actives, alors que nous avons pris en compte des molécules inactives. Certaines molécules inactives possédant un groupement accepteur de liaison hydrogène, ce "caractère" a certainement été enlevé dans notre cas lors de la phase soustractive de la génération du modèle de pharmacophore quantitatif (voir Section 6.1.2). Malgré la similarité qualitative entre le modèle de pharmacophore de Gitto et al. (2008) et celui que nous avons utilisé dans l'Article III, celui que nous avons utilisé a permis la découverte d'un composé original, LSP10-0500. Par contre, celui de Gitto et al. (2008) a conduit à la découverte d'un composé ressemblant fortement à ceux déjà développés par la compagnie pharmaceutique Gedeon Richter (Borza et al., 2003). Le modèle de pharmacophore quantitatif que nous avons utilisé dans l'Article III apporte donc des informations supplémentaires par rapport à celui de Gitto et al. (2008) pour la découverte de structures chimiques relativement originales.

6.2.1 Génération et validation d'un modèle de pharmacophore en vue d'un criblage virtuel

Le modèle de pharmacophore quantitatif que nous avons choisi pour réaliser le criblage n'est capable de prédire correctement que la moitié des activités des molécules du "training set". Ce modèle n'aurait donc pas pu être utilisé pour prédire quantitativement l'activité d'antagonistes potentiels des récepteurs GluN1/GluN2B. Deux raisons, provenant du "training set", peuvent être à l'origine de cette mauvaise prédiction :

– L'inhomogénéité des données d'activité biologique des molécules du "training set". Les activités biologiques des composés du "training set" proviennent de sources différentes et de méthodes de mesure différentes (électrophysiologie, déplacement

d'ifenprodil radioactif ou de Ro 25-6981 radioactif). Bien que les activités aient été normalisées par rapport à l'activité de l'ifenprodil mesurée selon la même technique (et si possible par les mêmes auteurs), des variations d'activités relatives peuvent exister selon la technique de mesure utilisée. Nous avons fixé l'erreur sur les activités expérimentales à un log d'activité afin d'inclure ces variations dans l'erreur expérimentale. Idéalement, il aurait fallu acheter et tester toutes les molécules du "training set" pour avoir des données homogènes. Cependant, la plupart des antagonistes des récepteurs NMDA sélectifs de la sous-unité GluN2B ont été développés par des firmes pharmaceutiques et ne sont pas disponibles commercialement. Il était donc difficile de re-tester les activités des composés du "training set".

– Un "training set" non optimal. La qualité du modèle de pharmacophore dépend énormément de la qualité du "training set" sélectionné. Nous avons essayé d'optimiser la qualité du "training set" en choisissant quatre molécules par log d'activité sur quatre log d'activité, et en essayant de les choisir les plus diverses possibles par log d'activité (voir Section 6.1.2). Il est possible que la sélection d'un autre "training set" aie donné de meilleurs résultats.

Cependant, malgré une relativement faible capacité à prédire les activités des molécules du "training set", les paramètres statistiques, coefficient r^2 de corrélation entre les activités prédites et les activités expérimentales et RMS sont corrects ($r^2 = 0.9$ et RMS = 1.32). Notre but n'étant pas de faire de la prédiction d'activité mais de détecter des composés actifs dans une collection de molécules, nous avons décidé de ne pas optimiser ce modèle et de le soumettre à l'analyse par les courbes ROC, analyse qui permet de déterminer si le modèle de pharmacophore est capable de détecter des molécules actives (voir Section 6.1.2). À l'issue de l'analyse par courbe ROC (voir Section 6.1.2), l'aire sous la courbe (AUC) était de 0.80, ce qui veut dire qu'une molécule active sélectionnée au hasard a huit fois sur dix une plus haute "fit value" (valeur utilisée pour quantifier la qualité de l'ajustement géométrique de la molécule sur le pharmacophore, voir Section 6.1.2) qu'une molécule

inactive sélectionnée au hasard (Triballeau et al., 2005). Ainsi, le modèle de pharmacophore sélectionnée ayant une AUC correcte, il n'a pas été plus optimisé et a été utilisé d'emblée pour cribler la base de données de la compagnie InterBioScreen Ltd (IBS).

Il est important de noter que pour réaliser un criblage virtuel (non pour prédire des activités), une valeur élevée d'AUC est plus importante que des paramètres statistiques élevés concernant le "training set". Par exemple, dans le but de rechercher des antagonistes compétitifs des récepteurs $mGlu_4$, Triballeau et al. (2006) ont généré deux modèles, l'un avec des paramètres statistiques très bons ($r^2 = 0.92$; RMS= 0.76) et bonne AUC (0.87), l'autre avec de mauvais paramètres statistiques ($r^2 = 0.62$; RMS= 1.62) mais une AUC très élevée (AUC= 0.95). Pour cribler la base de données CAP, Triballeau et al. (2006) ont choisi le deuxième modèle, celui ayant l'AUC la plus importante.

6.2.2 LSP10-0500, LSP10-0502 et LSP10-0504, des composés originaux ... mais à optimiser

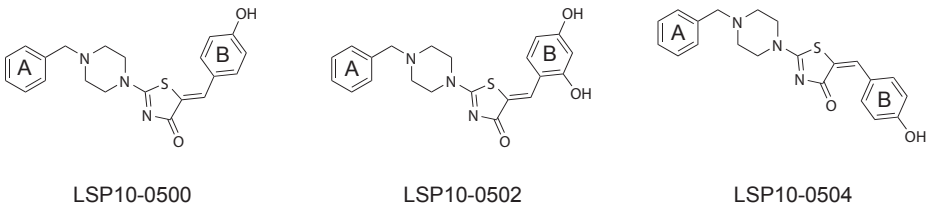


FIGURE 6.10 – Structures chimiques des hits LSP10-0500, LSP10-0502 et LSP10-0504

À l'issue du criblage de la base de données IBS, nous avons identifié un composé inhibant les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B et se liant dans le NTD de GluN2B, LSP10-0500 (FIGURE 6.10). Ceci constitue une validation supplémentaire du modèle de pharmacophore utilisé. De façon intéressante les extrémités de ce composé sont identiques à celles de l'ifenprodil, mais son coeur central, composé d'une thiazolone et d'un cycle piperazine, est original par rapport à tous les antagonistes sélectifs pour GluN2B déjà décrits. Cette originalité fait de LSP10-0500 une "touche" intéressante pour la conception

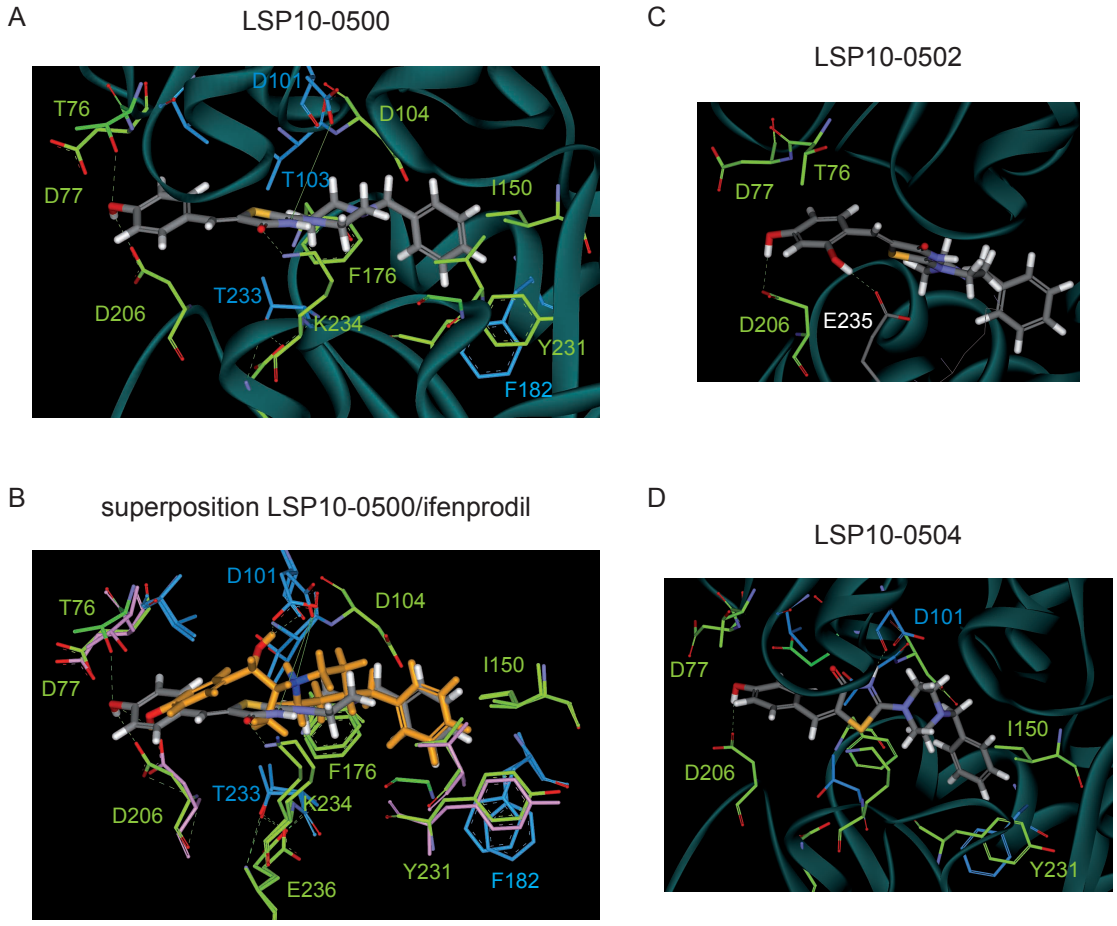


FIGURE 6.11 – Modes de liaison supposés des hits LSP10-0500 (A), LSP10-0502 (C) et LSP10-0504 (D) dans le NTD de la sous-unité GluN2B et comparaison des modes de liaison supposés de LSP10-0500 et de l'infeprodil. Les molécules ont été ancrées dans le modèle par homologie du NTD de GluN2B généré dans l'article précédent (Mony et al., 2009b). Le NTD de GluN2B est représenté sous forme de ruban vert foncé. Les ligands sont représentés sous forme de bâtonnets selon les couleurs conventionnelles (voir Annexe), sauf l'ifenprodil pour lequel les atomes de carbones sont colorés en orange. Le code couleur utilisé pour les résidus contactant les ligands est le même que dans Mony et al. (2009b) : vert (et rose en B), résidus contrôlant sélectivement la sensibilité à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B ; bleu, résidus contrôlant à la fois les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B.

de nouveaux antagonistes des récepteurs NMDA.

Nous avons voulu comparer le mode de liaison de ce composé par rapport à celui de l'ifenprodil. Pour ce faire, nous avons réalisé un ancrage moléculaire de LSP10-0500 dans le modèle par homologie du NTD de GluN2B décrit dans l'article II (Mony et al., 2009b). Depuis, une structure cristallographique du NTD de GluN2B a été publiée (Karakas et al., 2009). On notera, comme dit dans le chapitre précédent, que nous n'avons pas utilisé la structure cristallographique récemment publiée du NTD de GluN2B (Karakas et al., 2009), cette structure étant trop fermée pour pouvoir insérer l'ifenprodil ou toute molécule équivalente dans la fente interlobaire. Nous avons donc continué à utiliser un modèle par homologie du NTD de GluN2B, tout en gardant à l'esprit que les interactions des molécules avec le lobe II de ce modèle sont certainement plus fiables que celles avec le lobe I (les lobes II du modèle et de la structure cristallographique se superposant beaucoup mieux que les lobes I, voir Chapitre précédent). En particulier, nous ne discuterons pas de l'interaction de l'ifenprodil et de LSP10-0500 avec la boucle β3-α3, qui contient l'aspartate D101, car cette dernière interagit très probablement d'un façon différente avec l'ifenprodil que celle prédite (voir discussion de l'article II). Après ancrage moléculaire ("docking"), l'ensemble NTD+ligand a été soumis à une dynamique moléculaire de 1 ns. Comme montré dans la Figure 6.11B, LSP10-0500 et l'ifenprodil ont des modes de liaison similaires, surtout dans la région de la charnière où les parties benzyle des deux composés (cycle A ; Figure 6.10), ainsi que les résidus interagissant avec ces parties benzyle (I150, V262 et Y231) sont très bien superposés. Cette forte superposition des deux molécules au niveau de la charnière peut être interprétée comme le témoin d'une importante contrainte structurale au niveau de la charnière. Dans la partie externe de la fente interlobaire, la partie phénol de LSP10-0500 établit, comme l'ifenprodil, des liaisons hydrogène avec les résidus D206, T76 et D77, bien que ce composé soit légèrement plus long que l'ifenprodil. De façon intéressante, le groupement C=O du cycle thiazolone établit une liaison hydrogène avec le groupement ammonium de la lysine K234 (Figure 6.11A). Le mode de liaison de LSP10-0500 que nous

venons de décrire reste cependant purement spéculatif car nous n'avons pas testé l'effet de mutations du NTD sur l'action de ce composé. Dans le cas d'une démarche d'optimisation de cette touche, il serait intéressant de valider son mode de liaison grâce à des expériences fonctionnelles d'électrophysiologie et de mutagénèse dirigée.

LSP10-0500 inhibe les récepteurs GluN1/GluN2B avec une IC_{50} de $2,7\mu$M, une valeur 10 fois supérieure à l'IC_{50} de l'ifenprodil. Cette touche n'est donc pas très active envers les récepteurs NMDA et nécessite une optimisation. Nous avons donc décidé de rechercher des analogues de LSP10-0500 dans la base de données CAP afin d'obtenir des composés plus affins. Les résultats des analogues que nous avons sélectionnés et testés se sont révélés décevants, car nous n'avons pas trouvé de composé ayant une affinité apparente significativement meilleure que la "touche" initiale, LSP10-0500. La série des dérivés phényliques a été particulièrement décevante, car aucune des molécules sélectionnées n'était active, alors qu'elles étaient prédites comme potentiellement actives par le modèle de pharmacophore. Il semblerait donc que la présence d'un groupement méthyle espaçant le cycle piperazine du cycle phényle soit indispensable à l'activité des composés apparentés à LSP10-0500. La présence d'un groupement méthyle entre le cycle piperazine et le phényle a deux conséquences : cela augmente la longueur de la molécule, ainsi que son nombre de degrés de libertés. En effet, dans les dérivés phényle, le doublet électronique de l'azote proximal du cycle piperazine est conjugué avec les électrons du cycle aromatique A, ce qui fait que la partie phényle-piperazine est plane. Au contraire, dans les dérivés benzyle, cette partie fait un coude et le cycle A est libre de tourner. L'addition de groupements fluor, chlore ou méthyle sur le cycle aromatique A n'augmente pas l'activité des dérivés phényles (Table 6.4), suggérant que le manque d'activité ne vient pas de la longueur de la molécule, mais plutôt de sa rigidité. En effet, si l'on se fie aux modes de liaison de l'ifenprodil et de LSP10-0500, la partie phényle-piperazine interagit avec la charnière du NTD de GluN2B, qui est contrainte structuralement. Il est donc possible que les dérivés phényle, de par leur trop grande rigidité, ne puissent pas se fixer correctement dans le NTD ou qu'ils ne

puissent pas induire la fermeture du domaine.

Malgré ces résultats relativement décevants, deux composés, LSP10-502 et LSP10-0504 (FIGURE 6.10) présentent une activité légèrement supérieure à LSP10-0500 ($IC_{50} = 1.7\,\mu M$ et $1.8\,\mu M$, respectivement). Nous avons aussi ancré ces deux composés pour tenter d'expliquer leur légère meilleure affinité apparente. Le résultat obtenu pour le composé LSP10-0504 était inattendu car il était prédit comme peu actif par rapport à son diastéréoisomère LSP10-0500. En effet, à cause de la configuration différente de la double liaison C=C de la partie benzylidène (double liaison entre la thiazolone et le cycle aromatique A) qui change l'orientation du cycle A par rapport à LSP10-0500, il ne s'ajustait pas bien dans la forme de LSP10-0500 qui a servi à filtrer les analogues de LSP10-0500. La FIGURE 6.11D indique effectivement que LSP10-0504 n'adopte pas la même conformation que LSP10-0500 dans le NTD de GluN2B, ce qui pourrait expliquer pourquoi une activité de ce composé n'était pas attendue. LSP10-0502, qui possède deux groupements hydroxyle sur son cycle aromatique B (FIGURE 6.10), fait, par rapport à LSP10-0500, une liaison hydrogène avec le glutamate 235 (FIGURE 6.11C), un résidu qui ne contrôle pas la sensibilité à l'ifenprodil (Perin-Dureau et al., 2002). Il serait intéressant de tester l'effet de la mutation de E235 en alanine, par exemple, sur la sensibilité à LSP10-0502. Si cette mutation contrôle la sensibilité des récepteurs GluN1/GluN2B à LSP10-0502, cela constituerait une validation supplémentaire du modèle par homologie du NTD de GluN2B et cela permettrait éventuellement l'exploitation d'une nouvelle poche de liaison pour l'optimisation d'antagonistes sélectifs de la sous-unité GluN2B dérivés de LSP10-0502.

Chapter 7

Binding site and mechanism of positive allosteric modulators on NMDA receptors

7.1 Introduction

NMDA receptors (NMDARs) are a class of ionotropic glutamate receptors widely expressed in the central nervous system that mediate a component of excitatory synaptic transmission. These receptors are essential in numerous physiological processes, such as brain development, synaptic plasticity, learning and memory (Dingledine et al., 1999). However, aberrant activity of NMDARs (either hypo- or hyperactivity) can lead to neuronal death. Agents that alter NMDAR activity are thus of therapeutic interest. A distinctive feature of NMDARs is that they carry many extracellular regulatory sites that recognize ions or small molecule ligands, some of which (H^+, Zn^{2+}) are likely to regulate receptor function *in vivo*. Most of these sites mediate allosteric inhibition and have been characterised in detail. This is not the case of the so-called polyamine-binding site, a site that selectively mediates positive allosteric modulation of NMDARs containing the NR2B subunit (Williams et al., 1994).

Polyamines (spermidine and spermine) are polybasic aliphatic amines that are positively charged at physiological pH. They are present at high concentrations in the intra-

cellular medium and play important roles in protein synthesis and cellular growth. Extracellular polyamines produce three different effects on NMDARs: a voltage-dependent inhibition, a voltage-independent glycine-dependent potentiation and a voltage-independent and glycine-independent potentiation (Benveniste and Mayer, 1993; Rock and Macdonald, 1995; Williams, 1997; Igarashi and Kashiwagi, 2010). Polyamine-induced voltage-dependent inhbition is due to a block of the ion channel at hyperpolarised potentials, much like the block produced by the Mg^{2+} ion (Rock and MacDonald, 1992). Glycine-dependent potentiation can be observed when low concentrations of glycine are present in the extracellular medium, because polyamines can increase the apparent affinity of NMDARs for glycine (Benveniste and Mayer, 1993; Williams et al., 1994). Voltage-dependent inhibition and glycine-dependent potentiation occur at NMDARs containing the NR2A and NR2B subunits, but not at NMDARs containing the NR2C and NR2D subunits (Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994; Williams, 1995). The location of the polyamine glycine-dependent potentiating site is still unknown, but it may reside on the NR1 subunit that harbours the glycine binding site.

The third effect of polyamines, and the one that is studied in detail in this chapter, is a voltage-independent and glycine-independent potentiation, because it can be observed at depolarised potential and at a saturating concentration of glycine (McGurk et al., 1990; Benveniste and Mayer, 1993). With spermine, the EC_{50} for this effect is $\sim 150\,\mu$M and results in a maximal potentiation of around threefold (at pH = 7.3; Benveniste and Mayer, 1993). Remarkably, this type of potentiation occurs exclusively at NMDARs incorporating the NR2B subunit (Williams et al., 1994). The NR1 subunit also influences polyamine-induced voltage-independent and glycine-independent potentiation, the insertion of exon 5 in the lobe II of NR1 NTD strongly reducing this type of potentiation (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995).

Studies on recombinant receptors have shown that spermine induces its glycine-independent potentiating effect through the release of proton inhibition of NMDARs

(Traynelis et al., 1995, 1998). Although numerous studies have highlighted residues that control spermine sensitivity, the location of polyamine glycine-independent potentiating site is still unknown. The mutated residues were essentially acidic residues (glutamates and aspartates), because they are likely to make ionic interactions with the positively-charged spermine, as occurs in the bacterial periplasmic proteins in charge of the transport of polyamines in gram$^-$ bacterias (for instance, PotD; Sugiyama et al., 1996b,a; Kashiwagi et al., 1996b). Residues that control spermine sensitivity are scattered throughout the sequence of both NR1 and NR2B subunits (Williams et al., 1995; Kashiwagi et al., 1996a; Gallagher et al., 1997; Masuko et al., 1999). Furthermore, as mutations that decrease spermine sensitivity also decrease proton sensitivity, it is difficult to determine if these mutations directly influence spermine sensitivity by perturbating its binding site, or indirectly through the decrease in proton sensitivity. However, some mutagenesis, biochemistry and molecular modelling studies suggested a binding site of spermine at the level of NR1 and NR2B NTDs (Gallagher et al., 1997; Masuko et al., 1999; Huggins and Grant, 2005; Han et al., 2008). Nevertheless, the location of NR2B-specific spermine-binding site accounting for the glycine-independent and voltage-independent potentiation remains ill-defined.

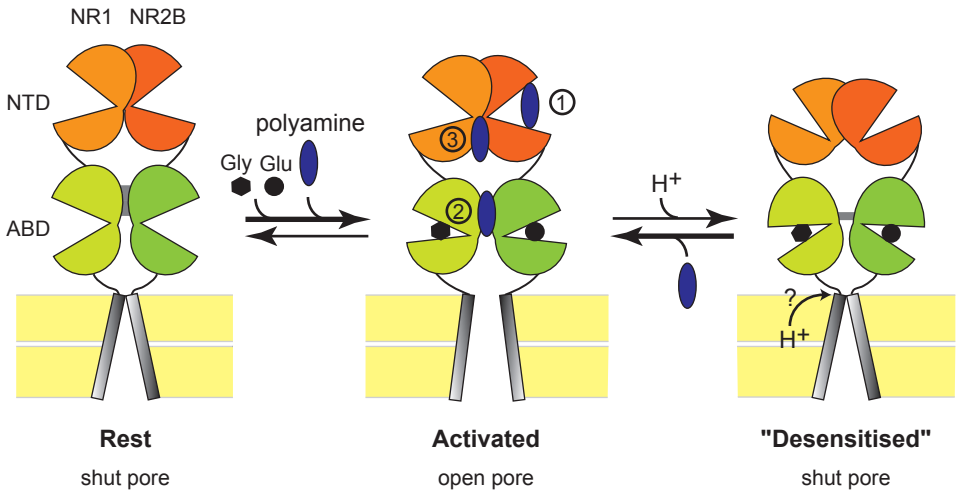


Figure 7.1 – Three different hypothesis for the mechanism of glycine-independent and voltage-independent potentiation of NR1/NR2B receptors by polyamines. Adapted from Mony et al. (2009a).

Moreover, the mechanism at the origin of polyamine-induced glycine-independent and voltage-independent potentiation of NMDARs is still unknown. Recent studies have dissected the mechanism that controls subunit-specific gating of NMDARs, revealing the key role of the NTDs (Gielen et al., 2008, 2009 and see Section 1.3.2). The authors propose that, under an application of saturating concentrations of glutamate and glycine, NMDARs oscillate between an active state and an inactive state, called "desensitised" because it resembles the desensitised state of AMPA and kainate receptors (Figure 7.1). This equilibrium between these two states explains that the maximal open probability of NMDARs is inferior to one. In the active state, the dimerisation interface between the agonist-binding domains is intact and the N-terminal domain (NTD) of the NR2 subunit is in an open-cleft conformation. Spontaneous or ligand-induced closure of the NTD of the NR2 subunit induces disruption of the ABD dimer interface and subsequent closure of the ion channel through binding of a proton (Figure 7.1). Moreover, it has been shown that destabilisation of the ABD dimer interface increases proton sensitivity (Gielen et al., 2008). From this mechanism, polyamine-induced decrease of proton sensitivity would occur through a stabilisation of the active state compared to the "desensitised" state of NR1/NR2B receptors. Three possible hypotheses can then explain NR2B-selective polyamine-induced potentiation (Figure 7.1):

1. As closure of the NTD of the NR2 subunit favours the entry of NMDARs in the "desensitised" state, we could first imagine that polyamines bind the interlobe cleft of NR2B NTD and prevent its closure. However, it has been shown that ifenprodil, a compound binding in the interlobe cleft of NR2B NTD, and spermine do not compete for the same binding site (Kew and Kemp, 1998). This hypothesis is therefore unlikely.

2. Polyamines bind at the dimer interface between NR1 and NR2B ABDs, thus preventing disruption of this interface and stabilisation of the active state. Polyamines would thus act according to a mechanism similar to that of the positive allosteric

modulators of AMPA receptors, such as cyclothiazide (Sun et al., 2002).

3. Polyamines bind at the lobe II dimer interface of NR1 and NR2B NTDs (supposing that the NTDs form heterodimers). By maintaining NTD lobes II close together, polyamines would prevent NR2B NTD from closing and thus stabilise the active state.

In the following work, by conbining functional and biochemical experiments, we sought to discriminate between the last two proposed mechanisms for NR2B-specific spermine potentiation.

7.2 Article IV

Binding site and mechanism of positive allosteric modulators on NMDA receptors

Laetitia Mony, Shujia Zhu, Stéphanie Carvalho, and Pierre Paoletti

7.2.1 Methods

Molecular Biology

The pcDNA3-based expression plasmids for rat NR1-1a (named NR1 herein), rat NR2A, mouse $\varepsilon 2$ (named NR2B herein), rat NR2C and rat NR2D and the sequencing procedure have already been described previously (Rachline et al., 2005; Paoletti et al., 1997). Chimeras exchanging full N-terminal domains (NR2A-2B(NTD), NR2A-2B(NTD+L), NR2B-2A(NTD) and NR2B-2A(NTD+L)) were obtained as described in Gielen et al. (2009). Single mutants were obtained by Quikchange® mutagenesis (Stratagene, La Jolla, CA). Chimeras exchanging the $\beta 6$–$\beta 8$ regions of NR2A and NR2B NTDs were also obtained by Quikchange® mutagenesis but with a modified protocol described in Geiser et al. (2001).

Two electrode voltage-clamp recordings and analysis

Recombinant NMDA receptors were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after coinjection of 30 nL of a mixture of cDNAs (at 10–30 ng/μL; nuclear injection) coding for various NR1-a and NR2 subunits (ratio 1:1). Oocytes were prepared, injected, voltage-clamped and superfused as described previously (Paoletti et al., 1997). Data were collected and analyzed using pClamp 9.2 (Axon Instruments, Foster City, CA). They were fitted using Sigmaplot 8.0 (SSPS, Chicago, IL). Error bars represent the standard deviation of the mean of this value.

The standard external solution used for recordings at pH 7.3 contained (in mM): 100 NaCl, 0.3 BaCl2, 5 HEPES, 2.5 KOH. The pH was adjusted to 7.3 with HCl. For recordings performed at a pH below 6.5, the concentration of HEPES was increased to compensate for the loss of buffering capacity of HEPES at acidic pH. The standard external solution contained (in mM): 60 NaCl, 0.3 BaCl2, 40 HEPES, 2.5 KOH. The pH was first adjusted to 10.3 with NaOH to set the concentration of Na^+ ions to 100 mM. Then pH was decreased to 6.5 with concentrated HCl. 10 μM DTPA was added to all the solutions to chelate contaminating zinc (Paoletti et al., 1997).

NMDA currents were induced by simultaneous application of saturating concentrations of L-glutamate and glycine (100 μM each). Unless notified, recordings were performed at a holding potential of -60 mV. All experiments were performed at room temperature.

Spermine recordings. Spermine powder was purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Mo, USA). Solutions of 200 μM spermine were made by directly diluting the powder into the standard agonist solution. When spermine sensitivity was measured at pH 8.3, spermine concentration was adjusted to 250 μM to compensate for the loss of protonation of the molecule at this pH. For spermine dose-response curves, a 10 mM stock solution was made by diluting the powder into the standard external solution. The spermine solutions of different concentrations were then obtained from the dilution of this stock solution, and agonists (100 μM glutamate and 100 μM glycine) were added. Experimental points of each cell were fitted using the following Hill equation: $I_{spermine}/I_0 = 1 + a/(1 + (\frac{IC_{50}}{[spermine]})^{n_H})$, where $I_{spermine}/I_0$ is the relative current, [spermine] is the spermine concentration, IC_{50} is the concentration of spermine producing 50 % of the maximal potentiation, n_H is the Hill coefficient and $(a + 1)$ represents the maximal potentiation at saturating spermine concentration. IC_{50}, a and n_H were set as free parameters. In the article, the mentioned spermine IC_{50}s and maximal potentiations are the means or the IC_{50}s and maximum potentiations calculated for each individual cell.

pH sensitivity experiments. Preparation of the solutions and analysis of experimental data were done according to Gielen et al. (2008).

MK801 kinetic experiments. MK801 powder was purchased from Ascent Scientific (Bristol, UK). MK801 was prepared as 100 μL aliquots (in bidistilled water) at 50 μM and stored at -20 °C. MK801 solutions of different concentrations (25–50 nM) were prepared by dilution of the 50 μM stock solution into the agonist solution. MK801 time-constants of inhibition (τ_{on}MK801) were obtained by fitting currents with a single-exponential component within a time window corresponding to 10–90 % of the maximal inhibition. Each τ_{on}MK801 was then normalised to the mean τ_{on} of wild-type NR1wt/NR2Bwt receptors measured the same day.

Methanethiosulfonate compounds. Methanethiosulfonate (MTS) compounds (Toronto Research Chemicals) were prepared as 25 μL aliquots at a concentration of 40 mM in water for MTSPtrEA, or as 10 μL aliquots at 200 mM in DMSO for the crosslinkers (M2M and M3M). Aliquots were stored at -20 °C and used within 15 min after thawing. For functional experiments, MTS reagents were used at a concentration of 200 μM. For the kinetics of MTSPtrEA-induced potentiation, MTSPtrEA time-constants of potentiation were obtained by fitting currents with a single-exponential component within a time window corresponding to 10–90 % of the maximal potentiation.

Cross-linking with bi-functional MTS reagents

Four to ten healthy oocytes per construct and per condition were tested for current. They were then incubated during 30 min, at 19 °C, in100 μL of a Barth solution (in mM: 88 NaCl, 1 KCl, 0.33 Ca(NO3)2, 0.41 CaCl2, 0.82 MgSO4, 2.4 NaHCO3, 10 HEPES, pH adjusted to 7.6 with NaOH) with gentamycin (50 μg/μL) containing either 1 % DMSO (control), or 2 mM MTS reagent.

Oocytes were then homogenised, at 4 °C, with a lysis buffer (20 mM Tris pH8 ; 50 mM NaCl ; 1 % N-dodecyl-β-D-maltoside ; protease inhibitor cocktail tablet *Roche Complete, Mini*), containing 1 mM N-ethylmaleimide, by pipetting with 10 μL per oocyte, until a homogenous suspension is obtained. Then, after two centrifugations at 16 000 g for 10 min at 4 °C, enriched membrane proteins supernatants are collected and used in western blot experiments.

Western blot analysis

Samples were separated in non-reducing conditions on 3–8 % SDS-PAGE gradient gels (four oocytes per well), dry-transferred to nitrocellulose membrane and immuno-blotted with either an anti-NR1 subunit (1:1000, mouse monoclonal MAB363, *Millipore*) or an anti-NR2B subunit (1:100, mouse monoclonal 13/NMDAR2B, *BD Transduction*) antibody. Proteins bands were visualized using secondary goat peroxydase-linked anti-rabbit and anti-mouse antibodies (1:10 000, *Jackson ImmunoResearch*), with the SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, *Thermo Scientific*.

Homology modelling of NR1/NR2B NTD dimer

A sequence alignment of rat NR1-1a and NR2B NTDs with the NTDs of the GluR2 and GluR6 subunits was generated with the online software ClustalW2 (EBI, http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html), and further refined using predicted (NR1) and known (NR2B NTD, pdb code 3JPW; GluR2, pdb code 3H5V; GluR6, pdb code 3H6G) secondary structures. Secondary structure elements of NR1 NTD were predicted using PROF predictions (http://www.predictprotein.org; Rost and Sander, 1993). Homology models for NR2B NTD were generated by the automated comparative modelling tool MODELER 9.0 (DS Modeling 2.0; Accelrys, San Diego, CA) as described previously (Bertrand et al., 2002). Models were generated by using the coordinates of both GluR2 and GluR6 NTD dimers and based on the sequence alignment described

in Figure 7.9. The structural quality of the models was assessed according to the MODELER probability density functions as well as Profiles-3D analysis (DS Modeling 2.0; Accelrys). Loops were refined using MODELER.

7.2.2 Results

Spermine potentiation is NR2B-specific and strongly pH dependent

Voltage-independent and glycine-independent spermine potentiation, which will be named spermine potentiation thereafter, proceeds through the relief of tonic inhibition of NMDA receptors by protons (Traynelis et al., 1995). As a consequence, spermine potentiation increases when extracellular pH decreases (Figure 7.2A). Consistently with values previously published (Williams et al., 1994; Benveniste and Mayer, 1993), 200 μM spermine (a concentration close to the EC_{50} at wild-type NR1/NR2B receptors) induced on NR1/NR2B receptors a potentiation of 1.33 ± 0.06 ($n = 5$) at pH 7.3 and at a holding potential of -60 mV (Figure 7.2A). At pH = 8.3, spermine potentiation is completely masked by spermine voltage-dependent inhibition ($I_{spermine}/I_0 = 0.6 \pm 0.1$; $n = 5$), whereas a very large potentiation can be seen at pH = 6.3 ($I_{spermine}/I_0 = 9.3 \pm 0.7$; $n = 4$).

Spermine selectively potentiates NMDARs containing the NR2B subunit (Williams et al., 1994). The fact that no spermine potentiation can be observed on NMDARs containing the NR2A, NR2C or NR2D subunits can arise from two different effects: (i) NR2A-, NR2C- or NR2D-containing NMDARs do not contain a spermine potentiation site; or (ii) these receptors do contain the spermine potentiation site, but binding of spermine to this site on NR2A-, NR2C- or NR2D-containing NMDARs produces no, or very little functional effect on channel activity. In particular, at physiological pH (7.3–7.5), NR1/NR2A receptors are only 20 % inhibited, whereas NR1/NR2B receptors are around 60 % inhibited (Low et al., 2000; Traynelis et al., 1995). As spermine effect is mediated by a decrease in pH sensitivity, a potentiation induced by spermine on NR1/NR2A receptors at physiological pH would be much lower than the one induced on NR1/NR2B receptors, and therefore possibly not visible on electrophysiological recordings. However, even at pH = 6.5, a pH

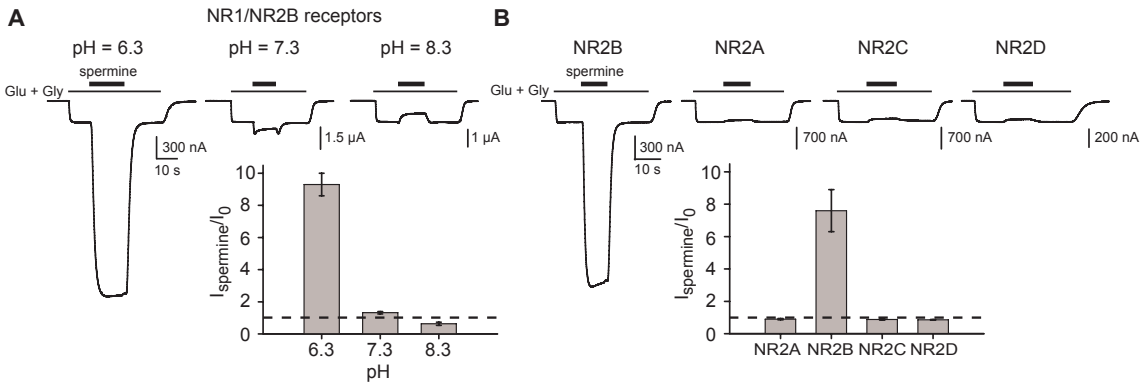


Figure 7.2 – **Properties of the glycine-independent and voltage-independent spermine potentiation**. A, spermine decreases proton sensitivity of NR1/NR2B receptors. Upper part: typical current traces obtained at different extracellular pH from oocytes expressing NR1wt/NR2Bwt receptors. Spermine was applied at a concentration of 200 μM. The bars upon the current traces indicate the duration of agonists and spermine applications. Lower part: intensity of modulation induced by 200 μM spermine depending on extracellular pH. Spermine-induced modulation values are 9.3 ± 0.7 ($n = 4$), 1.33 ± 0.06 ($n = 5$) and 0.6 ± 0.1 ($n = 5$) at pH 6.3, 7.3 and 8.3, respectively. The dashed line represents $I_{spermine}/I_0 = 1$, which corresponds to the absence of modulation by spermine. B, Spermine selectively potentiates NMDA receptors containing the NR2B subunit. Upper part: typical current traces obtained at pH = 6.5 from oocytes expressing NMDA receptors incorporating NR1wt and different NR2 subunits. Spermine was applied at a concentration of 200 μM. Lower part: intensity of spermine effect depending on the composition of NMDA receptors. Spermine-induced modulation values are 0.90 ± 0.04 ($n = 17$), 8.0 ± 1.6 ($n = 36$), 0.88 ± 0.04 ($n = 7$) and 0.86 ± 0.02 ($n = 7$) for NMDARs containing the NR2A, NR2B, NR2C and NR2D subunits, respectively. The dashed line represents $I_{spermine}/I_0 = 1$, which corresponds to the absence of modulation by spermine.

at which all NR1/NR2 subtypes of NMDARs are strongly inhibited (80 %, 96 %, 60 % and 90 % inhibition for NR1/NR2A, NR1/NR2B, NR1/NR2C and NR1/NR2D receptors, respectively), no spermine-induced potentiation could be seen on receptors containing the NR2A ($I_{spermine}/I_0 = 0.90 \pm 0.04$; $n = 17$), NR2C ($I_{spermine}/I_0 = 0.88 \pm 0.04$; $n = 7$) or NR2D subunit ($I_{spermine}/I_0 = 0.86 \pm 0.02$; $n = 7$), suggesting that these NMDAR subtypes probably do not contain spermine glycine-independent and voltage-independent modulatory site (Figure 7.2B).

At acidic pH, spermine induces massive potentiations ($I_{spermine}/I_0 = 8.0 \pm 1.6$ ($n = 36$) at pH = 6.5; Figure 7.2B). It is thus easier to study variations of spermine sensitivity at acidic pH. Moreover, contrary to physiological pH where great disparities of tonic proton inhibition exist between NMDAR subtypes, at acidic pH, these disparities are reduced. Difference of spermine sensitivity between two NMDAR constructs would then reflect a difference in spermine binding more than a difference in gating properties (proton sensitivity). We therefore decided to test spermine sensitivity of different NMDAR constructs by applying 200 μM spermine at pH 6.5.

Both NR1 and NR2B NTDs control spermine sensitivity

Many mutations that affect NR2B-specific spermine potentiation have been described (Williams et al., 1995; Masuko et al., 1999; Kashiwagi et al., 1996a, 1997). They are scattered throughout the extracellular regions of both NR1 and NR2B subunits, but it has been suggested that the N-terminal domains (NTDs) of NR1 and NR2B may contain spermine binding site (Masuko et al., 1999; Gallagher et al., 1997; Huggins and Grant, 2005; Han et al., 2008). However, as the majority of the mutations decreasing spermine sensitivity also decrease pH sensitivity, it is not clear whether they act directly, by disrupting spermine binding site, or only indirectly, by altering the pH sensitivity. We therefore investigated the role of NR1 and NR2B NTDs in the control of spermine sensitivity at pH 6.5. Deletion of NR2B NTD completely removed potentiation by 200 μM spermine

(NR1wt/NR2B-ΔNTD, $I_{spermine}/I_0 = 0.99 \pm 0.04$, $n = 8$; Figure 7.3A and 7.3B). As we could not obtain functional receptors bearing an NTD-deleted NR1 subunit (NR1-ΔNTD) co-expressed with a wild-type NR2B subunit, we used the constructs designed by Qiu et al. (2009) and co-expressed their NR1-ΔNTD subunit with an NR2B subunit containing a yellow fluorescent protein before its NTD (NR2B-YFP; Qiu et al., 2009). NR1-ΔNTD/NR2B-YFP receptors were functional when expressed in Xenopus oocytes and were insensitive to spermine ($I_{spermine}/I_0 = 1.00 \pm 0.01$; $n = 5$; Figure 7.3A and 7.3B). We verified that the NR1wt/NR2B-YFP receptors are still sensitive to spermine, which is the case, these receptors being even slightly more sensitive to spermine than wt NR1/NR2B receptors ($I_{spermine}/I_0 = 8.6 \pm 0.7$, $n = 4$). Our results therefore show that both NR1 and NR2B NTDs are necessary for spermine potentiation.

On the NR2B subunit, spermine sensitivity could also be removed by replacing NR2B NTD or NR2B NTD with the short linker connecting the NTD to the ABD by the corresponding residues of the spermine-insensitive NR2A subunit (NR1wt/NRB-2A(NTD): $I_{spermine}/I_0 = 1.0 \pm 0.1$, $n = 11$ and NR1wt/NR2B-2A(NTD+L): $I_{spermine}/I_0 = 0.94 \pm 0.05$, $n = 16$; Figure 7.3A and 7.3B). On the contrary, replacing NR2A NTD by NR2B NTD conferred spermine sensitivity to NR1/NR2A receptors (NR1wt/NR2A-2B(NTD): $I_{spermine}/I_0 = 2.3 \pm 0.2$, $n = 8$). Spermine potentiation could be increased by the substitution, on NR2A subunit, of both its NTD and the NTD-ABD linker by the corresponding ones of NR2B (NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) receptors: $I_{spermine}/I_0 = 5.1 \pm 1.1$, $n = 8$, Figure 7.3A and 7.3C). NR2B NTD is therefore necessary and sufficient for spermine sensitivity, strongly indicating that it contains spermine potentiating site. To further investigate the role of NR2B NTD and NTD-ABD linker on spermine sensitivity we performed full dose-response curves of the chimeras containing NR2B NTD at a pH where every chimera is 96 % inhibited (like wild-type receptors at pH 6.5), to remove any proton-dependent variability (pH = 6.50, 6.39 and 6.27 for receptors containing the NR2Bwt, NR2A-2B(NTD+L) and NR2A-2B(NTD) subunits, respectively; and see Figure 7.12 for

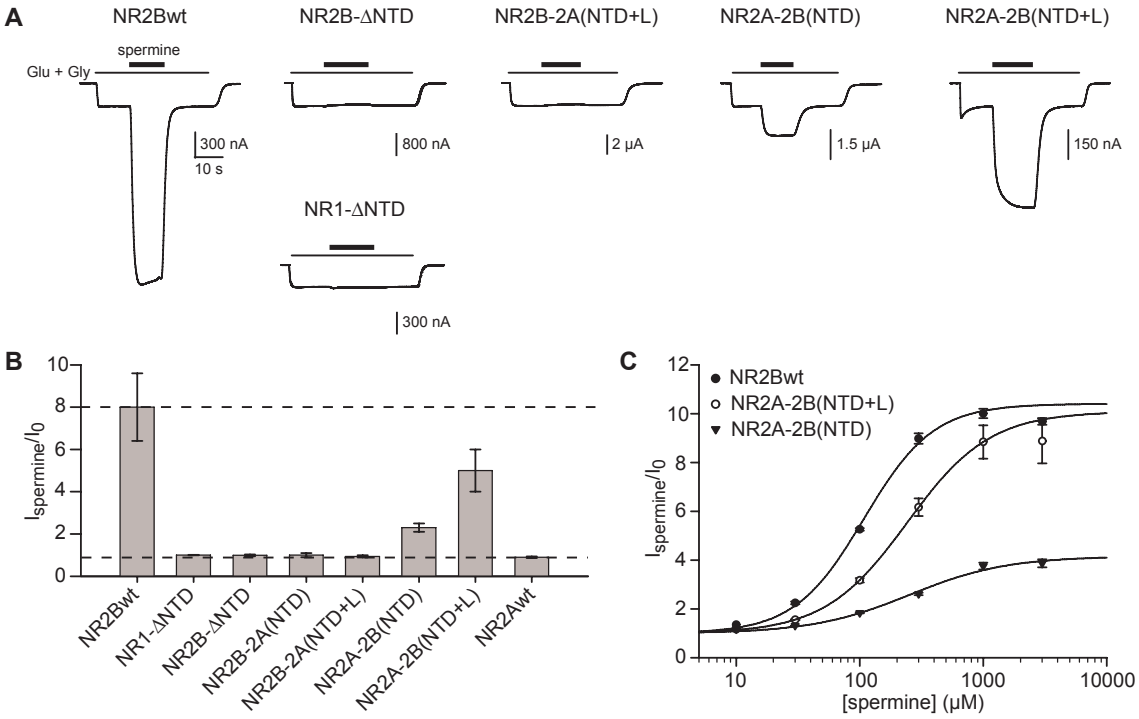


Figure 7.3 – **The NTD of both NR1 and NR2B subunit control spermine sensitivity of NMDARs**. A, typical current traces obtained at pH = 6.5 from oocytes expressing NMDA receptors incorporating NR1wt and different NR2 chimeric subunits, or NR1-ΔNTD and an NR2B subunit containing a YFP tag before its N-terminal domain (NR2B-YFP; Qiu et al., 2009). Spermine was applied at a concentration of 200 μM. B, Modulation of the different chimeric NMDARs induced by the application of 200 μM spermine. The lower dashed line represents spermine-induced inhibition of NR1wt/NR2Awt receptors; the upper dashed line represents spermine-induced potentiation of NR1wt/NR2Bwt receptors. Spermine-induced modulation values are 8.0 ± 1.6 ($n = 36$), 0.99 ± 0.04 ($n = 8$), 1.0 ± 0.1 ($n = 11$), 0.94 ± 0.05 ($n = 16$), 2.3 ± 0.2 ($n = 8$), 5.1 ± 1.1 ($n = 8$) and 0.90 ± 0.04 ($n = 17$) for NMDARs containing NR2Bwt, NR2B-ΔNTD, NR2B-2A(NTD), NR2B-2A(NTD+L), NR2A-2B(NTD), NR2A-2B(NTD+L) and NR2Awt subunits, respectively. C, Spermine dose-response curves of NMDARs containing NR2Bwt, NR2A-2B(NTD) and NR2A-2B(NTD+L) subunits. Spermine dose-response curves were made at a holding potential of -30 mV, at a pH where every receptor is 96 % inhibited by protons (pH of 6.50, 6.39 and 6.27 for receptors containing the NR2Bwt, NR2A-2B(NTD+L) and NR2A-2B(NTD) subunits, respectively). The spermine EC_{50}, maximal potentiation and Hill coefficient are, respectively: $108 \pm 3\,\mu$M, 10.4 ± 0.2 and 1.55 ± 0.09 ($n = 6$) for NR1wt/NR2Bwt receptors; $250 \pm 20\,\mu$M, 10.5 ± 0.2 and 1.30 ± 0.07 ($n = 5$) for NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) and $250 \pm 10\,\mu$M, 4.2 ± 0.2 and 1.10 ± 0.06 ($n = 5$) for NR1wt/NR2A-2B(NTD) receptors.

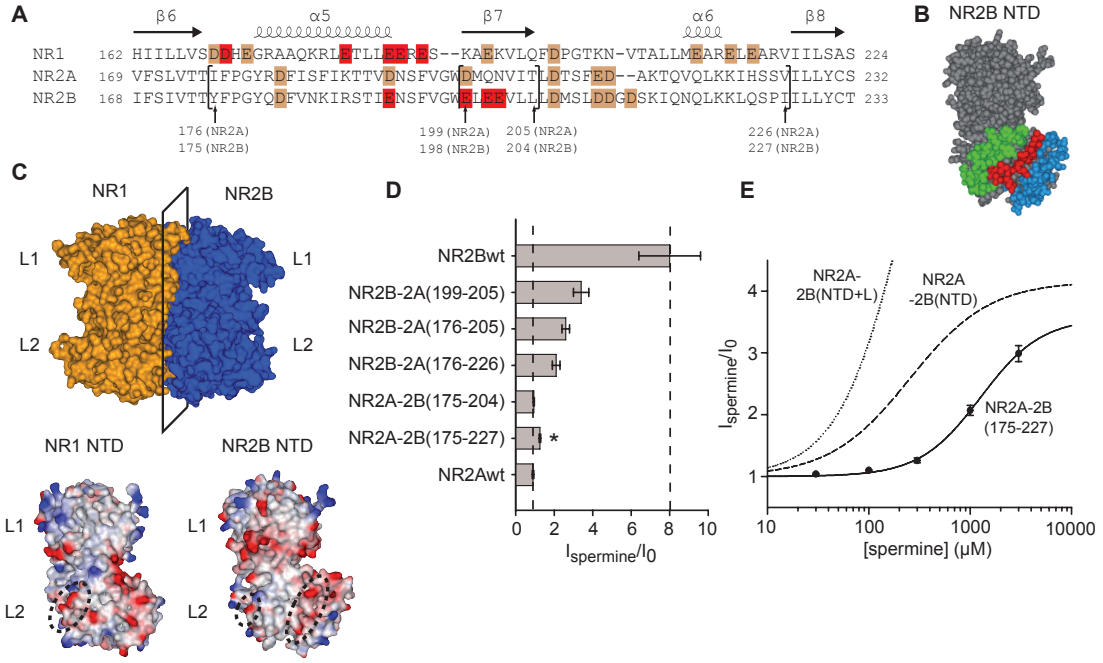
the pH IC_{50}s of these chimeras). NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) receptors showed a spermine-induced maximum potentiation similar to wild-type receptors (maximum potentiation of 10.5 ± 0.2, $n = 5$, for NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) *vs.* 10.4 ± 0.2, $n = 6$, for wt; Figure 7.3C), with only a 2-fold shift in EC_{50} between the two constructs ($EC_{50} = 250 \pm 20\,\mu M$ and $108 \pm 3\,\mu M$ for NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) and NR1wt/NR2Bwt, respectively). The chimera in which only NR2B NTD was transferred to the NR2A subunit, NR1wt/NR2A-2B(NTD), showed the same EC_{50} as NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) ($EC_{50} = 250 \pm 10\,\mu M$, $n = 5$), which suggests that, on the NR2 subunit, NR2B NTD may contain the majority of the determinants necessary for spermine binding. However the efficacy of spermine potentiation is much lower when only NR2B NTD, and not the NTD-ABD linker, is transferred to the NR2A subunit (maximum potentiation of 4.2 ± 0.2), indicating that NR2B NTD-ABD linker has an important role in the transduction mechanism that links spermine binding to the increase in channel opening. This transduction role of the NTD-ABD linker has already been demonstrated by Gielen et al. (2009), who showed that this linker is key to control the differences of open probability between NMDAR subtypes.

Spermine binds at a putative NTD dimer interface between NR1 and NR2B subunits

Our results showing that both NR1 and NR2B NTDs control spermine potentiation suggest a spermine binding site located at the interface between the two domains. We next investigated which region of NR1 and NR2B NTDs could control spermine potentiation. Spermine is polycationic and is therefore likely to interact with acidic residues on NMDAR subunits, as has been shown for the interaction of polyamines with the bacterial polyamine-binding protein PotD (Sugiyama et al., 1996b,a; Kashiwagi et al., 1996a). On the NR2B subunit, Kew and Kemp (1998) showed that spermine and ifenprodil do not compete for the same binding site. Spermine is therefore unlikely to contact the loops lining NR2B NTD interlobe cleft. Outside the NTD interlobe cleft, the region of NR2B NTD located

between β6 and β8 sheets (called β6–β8 region), in the second lobe, is particularly rich in acidic residues (red and salmon pink residues in Figure 7.4A). Moreover, it contains a cluster of glutamate residues that have been shown to control spermine sensitivity (red residues in Figure 7.4A; Masuko et al., 1999; Gallagher et al., 1997). The β6–β8 region of the NR1 subunit also contains residues that have been shown control spermine sensitivity (in red in Figure 7.4A; Masuko et al., 1999; Gallagher et al., 1997). In AMPA and kainate receptors, the corresponding region is involved in NTD dimerisation at the level of the second lobes (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009). The β6–β8 regions of NR1 and NR2B NTDs could therefore constitute a potential binding site for spermine. As the mutations described in Masuko et al. (1999) and Gallagher et al. (1997) also modify pH sensitivity, we tested the effects of these mutations at pH 6.5, a pH at which the variability of pH inhibition between mutants should be lower. Combinations of mutations into cysteine of residues located on NR1 (NR1-E181, NR1-E185, NR1E186 and NR1E188) or on NR2B (NR2B-E191, NR2B-E198, NR2B-E200 and NR2B-E201) strongly decreased spermine-induced potentiation (Figure 7.11). We also found another residue, NR2B-D206, which has a strong effect on spermine sensitivity. D206 was proposed to be involved in ifenprodil binding (Mony et al., 2009b), but, as it is located at the very border of the interlobe cleft, it may also participate in spermine binding-site. These results suggest the idea that NR1 and NR2B NTDs form heterodimers, as already proposed by Sobolevsky et al. (2009) for NR1/NR2A receptors, and that spermine binding site would thus be located at the interface between the second lobes of NR1 and NR2B NTDs.

The structure of the NTD of the NR2B subunit has been resolved by X-ray crystallography (Karakas et al., 2009), but the structure of an NMDAR NTD dimer is still unknown. To have an idea of a putative arrangement of an NR1/NR2B NTD dimer, we therefore decided to build a homology model of this dimer by using the coordinates of the recently crystallised NTD dimers of GluR2 and GluR6 subunits (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Figure 7.4A and 7.4C). Supposing that the NMDAR NTD dimer can adopt



a conformation similar to the one observed in AMPA receptors, we found that the β6–β8 regions of NR1 and NR2B NTDs do form an NTD dimer interface at the level of the second lobes. In our model, the residues previously shown to control spermine sensitivity point towards this dimer interface and face one-another (dashed circles in Figure 7.4C). The NR1-NR2B putative dimer interface of NTD lobes 2 is therefore a potential candidate for spermine binding, as already proposed by Huggins and Grant (2005). Interestingly, contrary to the β6–β8 regions of NR1 and NR2B subunits that are rich in negatively charged residues, the corresponding region of NR2A NTD contains much less negatively charged residues, as illustrated by the electrostatic potential surfaces of NR1, NR2A and NR2B NTDs (Figure 7.4A and 7.10). This raises the hypothesis that spermine could bind to NR1-NR2B NTD dimer interface, but not to the one of NR1/NR2A receptors, because of a weak negative electrostatic field in the β6–β8 region of NR2A NTD.

To verify that the β6–β8 region of NR2B NTD controls spermine sensitivity, we constructed chimeras in which parts of the β6–β8 region of NR2B NTD were replaced by the corresponding ones of NR2A NTD, and vice-versa. Introduction in NR2B subunit of the

Figure 7.4 – **The β6–β8 region in the lobe II of NR2B NTD is critical for spermine potentiation**. A, Sequence alignment of the β6–β8 regions of NR1, NR2A and NR2B subunits. The positions of indicated α-helices (coils) and β-strands (arrows) are from the X-ray structure of NR2B NTD (PDB 3JPW, Karakas et al., 2009). Secondary structures are numbered according to the secondary structures of the NTD of AMPA GluR2 subunit (Jin et al., 2009). Red boxes correspond to the acidic residues previously shown to control spermine sensitivity (Masuko et al., 1999). The other acidic residues located in the β6–β8 region are highlighted by salmon pink boxes. Brackets represent the limits of the different chimeras between the β6–β8 regions of NR2A and NR2B subunits. B, CPK representation of a model of NR2B NTD made by homology with GluR2 (PDB: 3H5V) and GluR6 NTDs (PDB: 3H6G). In green, red and blue are represented the different regions exchanged between NR2A and NR2B in the chimeras. In NR2B NTD, these regions correspond to: Y175-W197 (green), E198-L204 (red) and L205-I227 (blue). The combination of the green, red and blue regions forms the full putative NTD dimer interface between lobes II. C, Upper: Molecular surface for a putative NR1/NR2B dimer of NTDs. The NR1/NR2B NTD dimer was built by homology with the NTD dimers of GluR2 and GluR6 subunits. The open parallelogram represents the dimerisation interface. Lower: Electrostatic potential surface of NR1 and NR2B NTDs viewed from their putative dimerisation interface. Negatively charged residues are colored red, whereas positively charged residues are colored blue. Note the high density of negative charges in the lobe II dimerisation interface of both NR1 and NR2B subunits. Dashed circles represent the residues previously shown to control spermine sensitivity in Masuko et al. (1999). The dashed-circled regions of NR1 and NR2B NTDs face each other in the putative dimer. D, Spermine sensitivities of the different chimeras in the β6–β8 region of NR2A and NR2B NTDs. Spermine-induced modulation values are 3.4 ± 0.4 ($n = 8$), 2.6 ± 0.2 ($n = 7$), 1.9 ± 0.1 ($n = 5$), 0.94 ± 0.03 ($n = 10$) and 1.26 ± 0.04 ($n = 8$) for NMDARs containing the NR2B-2A(199–205), NR2B-2A(176–205), NR2B-2A(176–226), NR2A-2B(175–204) and NR2B-2A(175–227) subunits, respectively. The left dashed line represents spermine-induced inhibition of NR1wt/NR2Awt receptors; the right dashed line represents spermine-induced potentiation of NR1wt/NR2Bwt receptors. The star indicates that NR1wt/NR2A-2B(175–227) receptors can be potentiated by spermine. E, Spermine dose-response curve of NR1wt/NR2A-2B(175–227) receptors. The spermine EC_{50}, maximal potentiation and Hill coefficient are, respectively: 1.2 ± 0.1 mM, 3.6 ± 0.2 and 1.47 ± 0.04 ($n = 5$). The dashed and dotted curves represent, respectively, NR1wt/NR2A-2B(NTD) and NR1wt/NR2A-2B(NTD+L) spermine dose-response curves.

eight residues of NR2A forming the putative β7 strand (NR1wt/NR2B-2A(199–205) receptors; Figure 7.4A and 7.4B) induced a marked decrease of the potentiation induced by 200 μM spermine at pH = 6.5 ($I_{spermine}/I_0 = 3.4 \pm 0.4$, $n = 8$, for NR1wt/NR2B-2A(199–205) receptors; Figure 7.4C). Introducing longer parts of the β6–β8 region of NR2A NTD into NR2B NTD reinforced the decrease in spermine sensitivity ($I_{spermine}/I_0 = 2.6 \pm 0.2$, $n = 7$, for NR1wt/NR2B-2A(176–205) receptors and $I_{spermine}/I_0 = 1.9 \pm 0.1$, $n = 5$, for NR1wt/NR2B-2A(176–226) receptors; Figure 7.4C). The receptors containing the chimeric subunits NR2B-2A(199–205) and NR2B-2A(176–205) had a pH sensitivity close to wild-

type receptors (Figure 7.12), indicating that the loss of spermine potentiation seen with these chimeras really reflects a decrease in spermine binding. NR1wt/NR2B-2A(176–226) receptors have a strongly decreased proton sensitivity (pH $IC_{50} = 7.03 \pm 0.02$, $n = 5$) compared to wild-type receptors (pH $IC_{50} = 7.41 \pm 0.03$, $n = 15$, Figure 7.12), an effect which could contribute to the difference of spermine-induced potentiations between NR1wt/NR2B-2A(176–205) and NR1wt/NR2B-2A(176–226) receptors. From these results we notice that the shortest chimera induces almost as much effect as the longer ones. Interestingly, this small region contains two glutamates on NR2B, E200 and E201, that are replaced by neutral residues on NR2A (Q201 and N202). Individual mutation of NR2B-E200 and NR2B-E201 into a cysteine also induced an approximate two-fold decrease in spermine sensitivity ($I_{spermine}/I_0 = 4.2 \pm 0.7$, $n = 4$, for NR1wt/NR2B-E200C and $I_{spermine}/I_0 = 4.3 \pm 0.1$, $n = 3$, for NR1wt/NR2B-E201C). NR2B β7 sheet, and more particularly residues E200 and E201, are therefore likely to be key determinants for spermine sensitivity. Moreover, the fact that NR2A NTD does not contain these acidic residues may partly explain why spermine does not potentiate NR1/NR2A receptors. We next wanted to know if introduction of the β6–β8 region of NR2B NTD could induce spermine sensitivity in NR2A-containing NMDARs. Introduction of the region of NR2B between tyrosine 175 and leucine 204, which contains the majority of NR2B acidic residues that control spermine sensitivity (red residues in the alignment Figure 7.4A), did not induce any potentiation when 200 μM spermine was applied (NR1wt/NR2A-2B(175–204): $I_{spermine}/I_0 = 0.94 \pm 0.03$, $n = 10$). However, by replacing the full β6–β8 region of NR2A by the corresponding one of NR2B, we were able to confer spermine sensitivity to the chimeric NR1/NR2A-2B(175–227) receptors ($I_{spermine}/I_0 = 1.26 \pm 0.04$, $n = 8$, Figure 7.4C). The region between L205 and I227 appears thus mandatory to confer spermine sensitivity to NR2A-containing NMDARs, probably because of the difference of length of the loops between β7 sheet and α6 helix (see Figure 7.4A) that could induce a different structure of the β6–β8 region in NR2A and NR2B subunits. We built a full spermine dose-response

curve of NR1wt/NR2A-2B(175–227) receptors at pH = 6.27, a pH at which these receptors are 96 % inhibited, like wild-type receptors at pH 6.5 (Figure 7.4C). Compared to introducing the full NR2B NTD to the NR2A subunit, introducing only NR2B β6–β8 region induced a comparable maximal potentiation (maximal potentiation of 3.6 ± 0.2, $n = 5$, for NR1wt/NR2A-2B(175–227) *vs.* 4.2 ± 0.2 for NR1wt/NR2A-2B(NTD) receptors), but spermine sensitivity was decreased 5 fold ($EC_{50} = 1.2 \pm 0.1$ mM, $n = 5$, for NR1wt/NR2A-2B(175–227) receptors *vs.* $EC_{50} = 250 \pm 10\,\mu$M, for NR1wt/NR2A-2B(NTD) receptors). The fact that we were able to confer spermine sensitivity to NR2A-containing NMDARs by introducing the β6–β8 region of NR2B is a strong argument in favour of a spermine binding site located in the β6–β8 region of the NR2B subunit. However, as the simple introduction of this region cannot fully reproduce the phenotype of the receptor in which the whole NR2B NTD was transferred to the NR2A subunit, other determinants of NR2B NTD may be required to induce a full effect of spermine. This may also explain why the NR1/NR2B chimeras containing the β6–β8 region of NR2A still bear some spermine sensitivity. Therefore, the fact that the β6–β8 region of NR2B and that residues of the β6–β8 region of NR1 control spermine sensitivity indicates that spermine binds at a putative dimer interface between the second lobes of NR1 and NR2B NTDs.

NR1 and NR2B NTDs form heterodimers

Our suggestion that spermine binds between NR1 and NR2B NTDs is based on the strong assumption that NR1 and NR2B subunits form heterodimers at the level of their NTDs. Such an arrangement has been proposed by Sobolevsky et al. (2009) for NR1/NR2A NMDA receptors on the basis of crosslinking experiments at the level of the agonist-binding domains (ABDs), but it has not been formerly demonstrated at the level of the NTDs. To verify that the NTDs of NR1 and NR2B subunits do form heterodimers, we performed crosslinking experiments between residues located in the β6–β8 regions of NR1 and NR2B subunits. We constructed mutants that had a pair of cysteine residues, one in the NTD of

NR1 and one in the NTD of NR2B. Based on our homology model, we chose three positions, NR1-E181, NR2B-E198 and NR2B-E201 for cysteine substitution and further crosslinking with thiol-reactive, methanethiosulfonate (MTS) reagents (Figure 7.5A). Crosslinking with M2M of cysteines introduced at either the NR1-E181 and NR2B-E198 positions or the NR1-E181 and NR2B-E201 positions induced the apparition of a band at a molecular weight corresponding to an NR1/NR2B heterodimer, as revealed by Western blot analysis in non reducing conditions with an antibody against the NR1 subunit (Figure 7.5C). For the NR1-E181C/NR2B-E201C, this band of high molecular weight could also be revealed with an antibody against the NR2B subunit, further confirming the formation of a heterodimer. This band was not visible when no M2M was applied or when the wild-type NR1/NR2B or the single cysteine mutant NR1-E181C/NR2Bwt receptors were incubated with M2M (Figure 7.5C). These results therefore suggest that M2M has specifically crosslinked NR1 and NR2B NTDs when cysteines were introduced at the putative dimer interface between NR1 and NR2B NTDs. However, we were not able to obtain western blots revealed by the antibody against NR2B for the controls, NR1wt/NR2Bwt and NR1-E181C/NR2Bwt. Therefore, although our results suggest that NR1 and NR2B subunits do form heterodimers at the level of the NTDs, we need the confirmation that the high molecular band revealed by antibodies against NR2B for NR1E181C/NR2B-E201C receptors is not an artefact before firmly concluding. Interestingly, M2M application induced the formation of a band that corresponds to an NR1-NR1 homodimer for mutants containing a cysteine in the NR1 subunit (NR1-E181C/NR2Bwt, NR1-E181C/NR2B-E198C and NR1-E181C/NR2B-E201C). The formation of this band could be due to the crosslinking of the NR1/NR1 homodimers that can form spontaneously in the endoplasmic reticulum (Meddows et al., 2001; Papadakis et al., 2004).

In our homology model based on the crystallographic structures of GluR2 and GluR6 NTD dimers, the distances between the cysteines introduced at the NR1-E181 and NR2B-E198 positions, on the one hand, and at the NR1-E181 and NR2B-E201 positions, on the

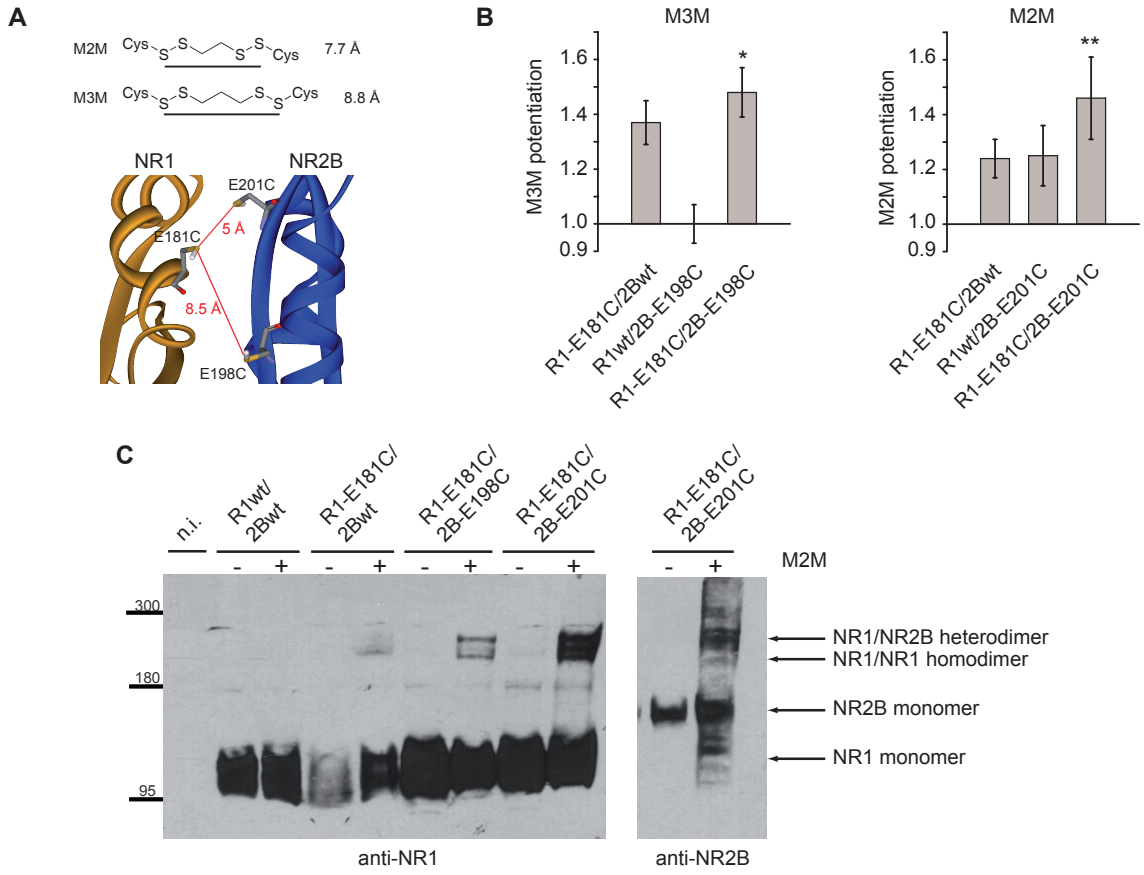


Figure 7.5 – **NR1 and NR2B NTDs assemble as heterodimers**. A, Chemical structures of the MTS reagents M2M and M3M and close-up view of the putative dimerisation interface between the lobes 2 of NR1 and NR2B NTDs, with cysteines introduced at the NR1-E181, NR2B-E198 and NR2B-E201 positions. B, Functional effects induced by the application 0.2 mM of M3M and M2M on receptors where cysteines were introduced at the NR1-E181, NR2B-E198 and NR2B-E201 positions. M3M-induced potentiations are 1.37 ± 0.08 ($n = 7$), 1.00 ± 0.07 ($n = 3$) and 1.48 ± 0.09 ($n = 6$) for NR1-E181C/NR2Bwt, NR1wt/NR2B-E198C and NR1-E181C/NR2B-E198C receptors, respectively. *, $p < 0.05$ compared with NR1-E181C/NR2Bwt receptors. M2M-induced potentiations are 1.24 ± 0.07 ($n = 14$), 1.3 ± 0.1 ($n = 6$) and 1.5 ± 0.2 ($n = 12$) for NR1-E181C/NR2Bwt, NR1wt/NR2B-E201C and NR1-E181C/NR2B-E201C receptors, respectively. **, $p < 0.01$ compared with both single cysteine mutants. C, Western blots of non-injected oocytes (n.i.) and oocytes expressing the NR1wt/NR2Bwt, NR1-E181C/NR2Bwt, NR1-E181C/NR2B-E198C and NR1-E181C/NR2B-E201C receptors, run under non-reducing conditions.

other hand, are of 8.5 and 5 Å, respectively (Figure 7.5A). These distances are close to the length of the M2M molecule (7.7 Å). This suggests that the NR1/NR2B NTD dimer may exist in a conformation similar to the NTDs of the AMPA and kainate receptors.

Maintaining the lobes II of NR1 and NR2B NTDs in close apposition increases NMDAR activity

What is the mechanism by which spermine potentiates NMDA receptors? Under saturating concentrations of glutamate and glycine, NMDARs are not permanently open: their maximal open probability (Po) is inferior to one. NMDAR Po is determined by the nature of the NR2 subunit (Chen et al., 1999; Erreger et al., 2005; Gielen et al., 2009; Wyllie et al., 1998; Dravid et al., 2008). Thus, NR2A-containing receptors have the highest Po (Po $\sim$0.5), whereas NR2B-containing receptors have a lower Po (Po $\sim$0.1). Recently, Gielen et al. (2009) have proposed that spontaneaous oscillations of the NTD of the NR2 subunit control the Po of different NMDAR subtypes, the closure of the NTD inducing the closure of the ion channel. Moreover, on NR2A-containing receptors, it has been proposed that zinc binding, which is believed to provoke the closure of NR2A NTD, induces the entry of NMDARs into an inhibited state resembling the desensitised state of AMPA and kainate receptors (Mayer, 2006; Gielen et al., 2008). By combining these two results, they propose that under application of saturating concentration of agonists, the NMDAR macroscopic currents are the result of an equilibrium of NMDARs between an active state (open channel and open NR2 NTD) and a desensitised-like state (closed channel and closed NR2 NTD; Figure 7.8). According to this model, polyamine-induced potentiation would then result from a shift of the equilibrium towards the active state.

We have shown that spermine binds at the putative lobe II NTD dimer interface between NR1 and NR2B subunits. We have also shown that the regions involved in the putative lobe II NTD dimer interface, the β6–β8 regions, are enriched in negatively charged residues, negative residues that are likely to face each other if NTD lobes II contact each

other (Figure 7.4A and 7.4C). From these results, we propose that electrostatic repulsion between the lobes II of NR1 and NR2B NTDs is a parameter that drives the entry of NMDARs into the desensitised-like state. Positively-charged polyamines would then shield the negative charges of NR1 and NR2B NTDs and prevent their lobes II from moving away. This, in turn, would shift the equilibrium towards the active state of NMDARs. A similar mechanism has already been shown for the dimer of glutamate-binding domains of mGluR1, domains which contain a patch of polar residues at their lobe II dimer interface (Kunishima et al., 2000; Tsuchiya et al., 2002). If our hypothesis is true, preventing the NTD lobes II from moving away from each other would potentiate NMDAR currents. Moreover, introducing positive charges in the $\beta6$–$\beta8$ region of the NTDs of NR1 and/or NR2B subunits would decrease electrostatic repulsion between negative residues and favour the "active" orientation, also increasing NMDAR activity.

We first analysed the functional effects induced by tethering the lobes II of NR1 and NR2B NTDs. We performed crosslinking experiments with two MTS compounds, M2M and M3M. We have already shown that M2M could crosslink NR1 and NR2B subunits when cysteines were introduced in both subunits (see above and Figure 7.5C). Application of 0.2 mM of M2M on single cysteine mutants, NR1-E181C/NR2Bwt and NR1wt/NR2B-E201C, induced a potentiation of NMDAR currents (MTS potentiation of 1.24 ± 0.07, $n = 14$, and 1.3 ± 0.1, $n = 6$, for NR1-E181C/NR2Bwt and NR1wt/NR2B-E201C, respectively; Figure 7.5B). As no crosslinking was seen for NR1-E181C/NR2Bwt receptors in Western blot analysis (Figure 7.5C), we attributed these potentiations to a side, non crosslinking action of M2M. On the contrary, crosslinking by M2M was observed with the double cysteine mutant NR1-E181C/NR2B-E201C (see above) and this receptor was potentiated (1.5 ± 0.2)-fold ($n = 12$) after an application of 0.2 mM M2M, a value which is significantly higher than the potentiations found for the single cysteine mutants (Figure 7.5B). This suggests that tethering NR1 and NR2B lobes II together could increase NMDAR activity. Similar results were obtained after an application of a longer MTS com-

pound, M3M (Figure 7.5A), on NR1-E181C/NR2B-E198C receptors (MTS potentiation of 1.48±0.09, $n = 6$; Figure 7.5B). Preliminary immunoblot experiments with an antibody against NR1 indicated that M3M could indeed crosslink the NR1 and NR2B subunits of this receptor (data not shown). M3M also induced a potentiation of the single-cysteine mutant NR1-E181C/NR2Bwt (MTS potentiation of 1.37 ± 0.08, $n = 7$), but this potentiation was significantly lower that the one observed with the double-cysteine mutant and was attributed to a side effect of M3M on this mutant. We have previously observed that M2M could also crosslink NR1-E181C/NR2B-E198C receptors. However, the potentiation observed after an application of M2M on these receptors was not significantly different from the one observed for NR1-E181C/NR2Bwt receptors (M2M potentiation of 1.24±0.07, $n = 14$ for NR1-E181C/NR2Bwt *vs.* 1.22±0.17, $n = 9$, for NR1-E181C/NR2B-E198C receptors). We therefore cannot conclude for the functional effects of M2M on NR1-E181C/NR2B-E198C receptors. M2M and M3M are short crosslinkers (length of 7.7 and 8.8 Å, respectively). Judging from our homology model of an NR1/NR2B dimer, these lengths correspond to the distances between NR1-E181 and NR2B-E198, on the one hand, and NR1-E181 and NR2B-E201, on the other hand, when the lobes II are in close apposition (see Figure 7.5C). Therefore, our crosslinking experiments indicate that preventing the lobes II of NR1 and NR2B NTDs from moving away from each other can induce an increase in NMDAR activity, which is in agreement with our proposal that the repulsion of the lobes II induces the entry of NMDARs into a "desensitised" state.

Mimicking spermine potentiation by introducing positive charges in the NR1/NR2B NTD lobe II dimer interface

We next investigated whether reversing the polarity of some of the negative residues located at the lobe II NTD dimer interface could increase the activity of NMDA receptors by decreasing the electrostatic repulsion between NR1 and NR2B NTDs. Acidic residues of the β6–β8 region were mutated into positively charged, arginine residues (or a lysine in

the case of D206). Introducing one positively-charged residue in the β6–β8 region of NR1 or NR2B NTDs strongly reduced spermine sensitivity at pH = 6.5, as exemplified by the NR1-E181R/NR2Bwt mutant ($I_{spermine}/I_0 = 1.9 \pm 0.1$, $n = 4$) or the NR1wt/NR2B-E201R receptor ($I_{spermine}/I_0 = 1.43 \pm 0.08$, $n = 11$) (see Figure 7.6A and 7.6B and Figure 7.13 for other mutations). Spermine potentiation could even be completely abolished by introducing two or three arginine residues in the NR1/NR2B lobe II dimer interface (see for instance NR1-E181R/NR2B-E201R receptors, $I_{spermine}/I_0 = 0.83 \pm 0.07$, $n = 9$, or NR1-E181R/NR2B-E198R-E201R, $I_{spermine}/I_0 = 0.86 \pm 0.03$, $n = 2$; Figure 7.6A and 7.6B and Figure 7.13). Globally, the effects on spermine sensitivity of these positively charged arginine mutants were much more important than the effects observed with the neutral cysteine mutations (see above and Figure 7.11), which is expected if the positively charged spermine makes ionic interactions with these residues. Complete disruption of spermine sensitivity through introduction of positive charges in the β6–β8 regions of NR1 and NR2B NTDs further confirms the location of spermine binding site in this area.

We then evaluated the effect of charge reversion in the lobe II NTD dimer interface on NMDAR activity by measuring their time constant of inhibition by MK801 (τ_{on}MK801), a macroscopic method used to evaluate the open probability (Po) of NMDARs (Blanke and VanDongen, 2008; Chen et al., 1999; Gielen et al., 2009). As some variability exists for MK801 inhibition time constants between series of experiments, the τ_{on}MK801 found for each mutant were normalised compared to the τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Bwt receptors measured the same day. The τ_{on}MK801 of every combination of the NR1wt, NR1-E181R and NR1-E185R subunits, on the one hand, and NR2Bwt, NR2B-E191R, NR2B-E198R, NR2B-E200R and NR2B-E201R subunits, on the other hand, were measured. The results are reported in Figure 7.14. In the following discussion, we will take as an example the results obtained with the combination of NR1wt and NR1-E181R subunits with the NR2Bwt, NR2B-E198R and NR2B-E201R subunits (Figure 7.6C). Converting one acidic residue located in the lobe II dimer interface of either NR1 or NR2B subunit

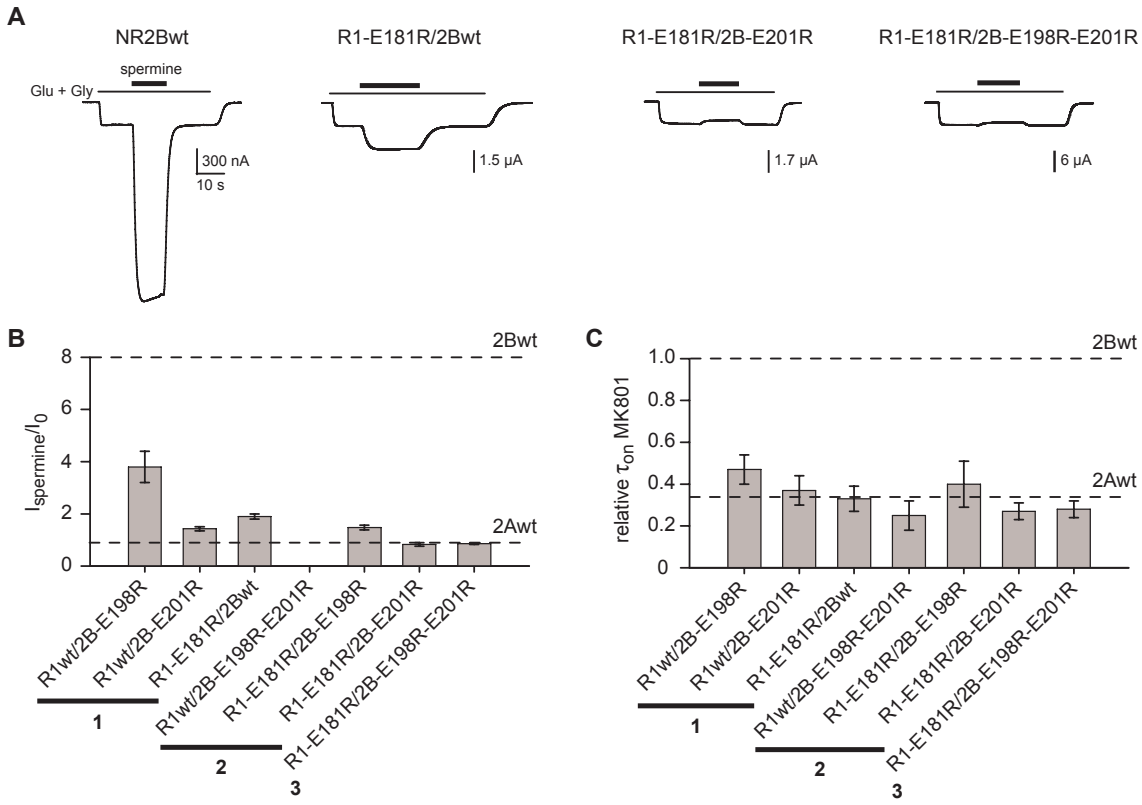


Figure 7.6 – **Introduction of positive charges in NR1/NR2B lobe 2 dimer interface mimics the effect of spermine**. A, typical current traces obtained at pH = 6.5 from oocytes expressing NMDA receptors in which glutamates located in the putative lobe 2 dimer interface between NR1 and NR2B NTDs were substituted by arginines. Spermine was applied at a concentration of 200 μM. Note that the mutants NR1-E181R/NR2B-E201R and NR1-E181R/NR2B-E198R-E201R are spermine-insensitive. B, Spermine sensitivities of a series of arginine mutants substituted at the NR1-E181, NR2B-E198 and NR2B-E201 positions. The bold numbers indicate the single, double and triple arginine mutants in which 1, 2 or 3 acidic residues were mutated into an arginine. The lower dashed line represents spermine-induced inhibition of wt NR1/NR2A receptors and the upper dashed line spermine-induced potentiation of wt NR1/NR2B receptors. C, Inhibition time constant by MK801 (τ_{on}MK801) of the series of arginine mutants substituted at the NR1-E181, NR2B-E198 and NR2B-E201 positions, normalised to the τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Bwt receptors (relative τ_{on}MK801). The upper dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of wt NR1/NR2B (relative τ_{on}MK801 = 1) receptors and the lower dashed line the relative τ_{on}MK801 of wt NR1/NR2A receptors (relative τ_{on}MK801 = 0.34 ± 0.08, $n = 26$).

into a positively charged residue was sufficient to strongly increase the open probability of the receptors (Figure 7.6C and Figure 7.14). For instance, the NR1wt/NR2B-E201R receptors had a relative τ_{on}MK801 of 0.37 ± 0.07 ($n = 8$) (the relative τ_{on}MK801 being 1 for NR1wt/NR2Bwt receptors) and the NR1-E181R/NR2Bwt receptors a relative τ_{on}MK801 of 0.33 ± 0.06 ($n = 4$). These inhibition time constants were very close to the one of NMDARs containing the NR2A subunit, the NMDAR subtype that has the highest Po (relative τ_{on}MK801 $= 0.34 \pm 0.08$, $n = 26$). Adding a supplementary positively charged residue further increased the activity of NMDARs, leading to NR1/NR2B receptors that have a very high Po, even higher than the Po of NR2A-containing NMDARs, as exemplified by the NR1-E181R/NR2B-E201R receptors (relative τ_{on}MK801 $= 0.27 \pm 0.04$, $n = 15$) or the NR1wt/NR2B-E198R-E201R receptors (relative τ_{on}MK801 $= 0.25 \pm 0.07$, $n = 3$). Receptors carrying three arginine residues also had a very high Po, indicating that the lobe II dimer interface can accommodate three bulky arginine residues. Therefore, our results show that positive residues introduced in the β6–β8 region can mimic the effect of spermine, by increasing NMDAR activity. Our results also confirm that electrostatic repulsion between the negatively-charged β6–β8 regions of NR1 and NR2B NTDs may control the Po of NR1/NR2B receptors, and that introducing positive charges, either with spermine or with arginines or lysines, can increase Po by maintaining NR1 and NR2B NTD lobes II in close apposition (by replacing electrostatic repulsion by electrostatic attraction).

If electrostatic repulsion is the driving force of the entry of NMDARs into a "desensitised" state, then adding more positive charges in the lobe II NTD dimer interface would eventually lead to a decrease in open probability, due to repulsion between the introduced positive residues. To test this hypothesis, we are currently designing NR1 and NR2B subunits in which all the acidic residues that were shown to control spermine sensitivity, E181, E185, E186 and E188 on NR1 NTD and E191, E198, E200, E201 and D206 on NR2B NTD, were mutated into an arginine (or a lysine in the case of D206). If our hypothesis is true, the obtained NR1-E4R/NR2B-E4R-D206K receptor is expected to have a low open

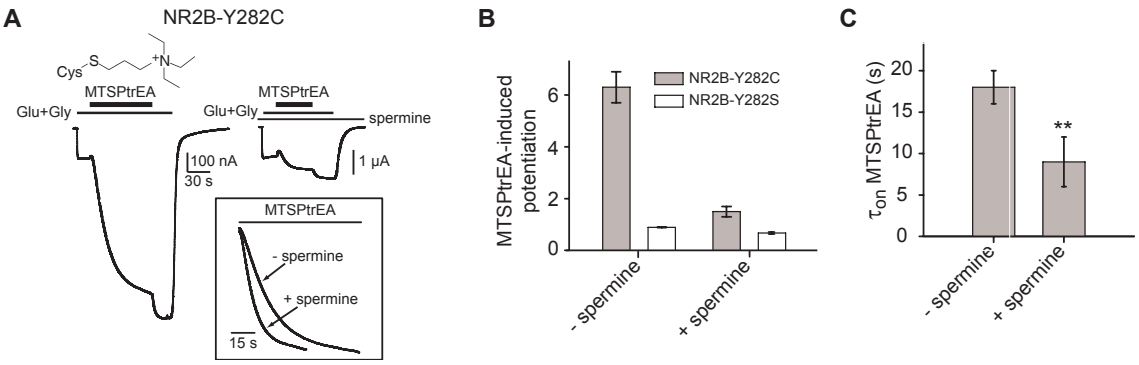


Figure 7.7 – **Spermine stabilises an open-cleft conformation of NR2B NTD**. A, Typical current traces obtained at pH = 7.3 for NR1wt/NR2B-Y282C receptors during treatment with MTSPtrEA, or with MTSPtrEA and spermine. Spermine and MTSPtrEA were applied at a concentration of 200 μM. The potentiation after washout of MTSPtrEA may reflect the washout of a reversible pore-blocking effect of the positively charged molecule. Inset: superposition of the normalised potentiation phases of the current traces during the application of MTSPtrEA, in the presence or in the absence of spermine. Note that the MTSPtrEA-induced potentiation is faster in presence of spermine. B, Amplitudes of MTSPtrEA induced potentiations on NR1wt/NR2B-Y282C and NR1wt/NR2B-Y282S receptors in the presence or absence of 200 μM spermine. The amplitudes of MTSPtrEA potentiation are 6.3 ± 0.6 ($n = 16$) and 0.89 ± 0.01 ($n = 3$) for NR1wt/NR2B-Y282C and NR1wt/NR2B-Y282S, respectively, in the absence of spermine, and 1.6 ± 0.2 ($n = 16$) and 0.67 ± 0.04 ($n = 3$) for NR1wt/NR2B-Y282C and NR1wt/NR2B-Y282S, respectively, in the presence of 200 μM spermine. Note that the NR1wt/NR2B-Y282S receptors are not potentiated by MTSPtrEA, consistent with the fact that the observed potentiations of the cysteine mutants are due to the reaction of the MTS with the introduced cysteines. C, Time constants of potentiation by 200 μM MTSPtrEA (τ_{on}MTSPtrEA) of NR1wt/NR2B-Y282C receptors. The τ_{on}MTSPtrEA are 18 ± 2 s ($n = 16$) in the presence of spermine and 9 ± 3 s ($n = 17$) in the absence of spermine. **, $p < 0.01$.

probability, like wild-type NR1/NR2B receptors.

Spermine stabilises NR2B NTD in an open-cleft conformation

Gielen et al. (2009) have previously shown that spontaneous oscillations of the NTD of the NR2 subunit control the open probability of NMDA receptors, the closure of the NTD favouring the closure of the ion channel. This conclusion was obtained by showing that modification of cysteines introduced in the interlobe cleft of NR2 NTD by bulky MTS reagents, which are supposedly maintaining the NTD in an open-cleft conformation, induces an increase in NMDAR activity. We used this strategy to probe for spermine mechanism of action. The bulky, positively charged MTS reagent 3-(triethylammonium)propylme-

thanethiosulfonate bromide (MTSPtrEA; Figure 7.7) was applied at pH = 7.3 and at a concentration of 200 μM on NR1wt/NR2B-Y282C receptors, in the absence or in the presence of 200 μM spermine (Figure 7.7A). As expected from an increase in channel Po by spermine, the amplitude of MTSPtrEA-induced potentiation was lower in the presence of spermine (1.6 ± 0.2, $n = 16$, in the presence of spermine *vs.* 6.3 ± 0.6, $n = 16$, in the absence of spermine; Figure 7.7A and 7.7B). No potentiation was seen on the control mutants NR1wt/NR2B-Y282S, confirming the specificity of MTSPtrEA-induced potentiation (Figure 7.7B). Most importantly, MTSPtrEA-induced increase in current was significantly faster in the presence of spermine (τ_{on}MTSPtrEA $= 9 \pm 3$ s, $n = 17$) than in its absence (τ_{on}MTSPtrEA $= 18 \pm 2$ s, $n = 16$; Figure 7.7C). Tyrosine 282 is a residue of NR2B NTD interlobe cleft located in the hinge, which is accessible to the solvent only when the domain is open (Karakas et al., 2009; Mony et al., 2009b). The faster kinetics of cysteine modification in the presence of spermine indicate that the NR2B-Y282 position is more accessible and thus that the domain spends more time in an open conformation. The lower amplitude of MTSPtrEA potentation observed when spermine was applied in the medium can then be explained by a higher basal Po of NR1/NR2B receptors and to a higher proportion of NTDs that are in an open-cleft conformation in the presence of spermine. This result is therefore in agreement with the proposal of Gielen et al. (2009), that an open NTD favours the active state.

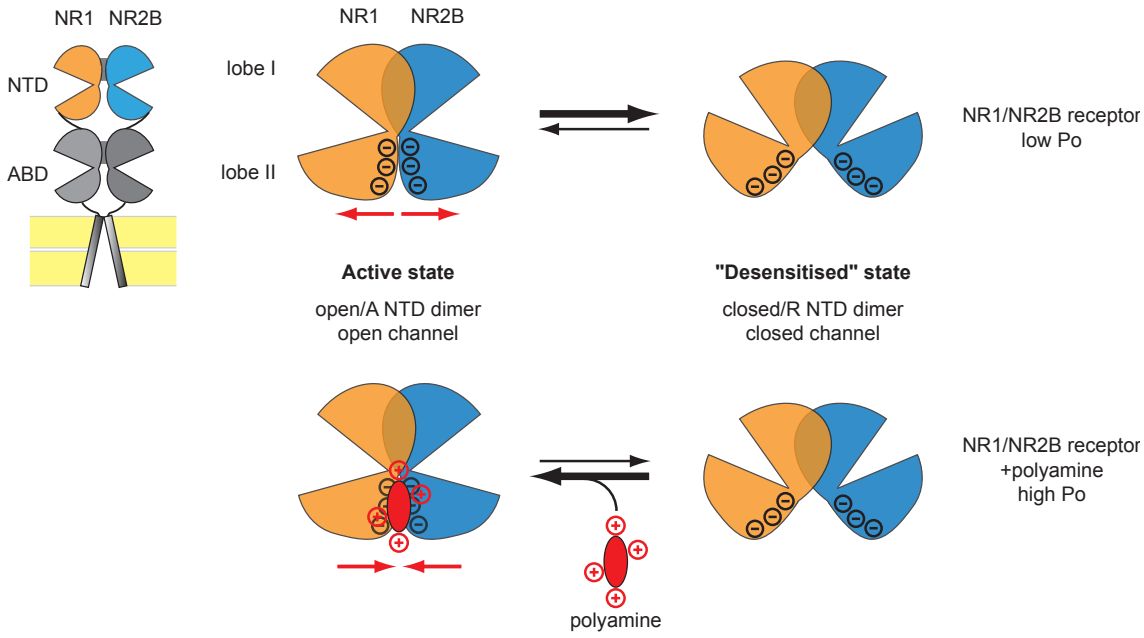


Figure 7.8 – **Proposed mechanism of the positive allosteric modulation of NR2B-containing NMDARs by polyamines**. NR1 NTD is represented in orange and NR2B NTD in blue. In basal conditions, NR1/NR2B receptors have a low Po because of electrostatic repulsion (red arrows) between the lobes II of NR1 and NR2B NTDs. This favours entry of NMDARs into a "desensitised" state characterised, at the level of the NTDs, by disruption of the NTD lobe II dimer interface (R orientation, for "resting") and closure of NR2B NTD. NR1 NTD is represented as the symmetric of NR2B NTD, although its conformationnal changes are unknown. Polyamines shield the negative charges of the lobe II NTD dimer interface and convert electrostatic repulsion into attraction, favouring the active state (characterised by an intact NTD dimer interface and an NR2B NTD in an open-cleft conformation). NR1 NTD is represented as the symmetric of NR2B NTD, although the conformational changes of this domain are unknown.

7.2.3 Supplementary figures

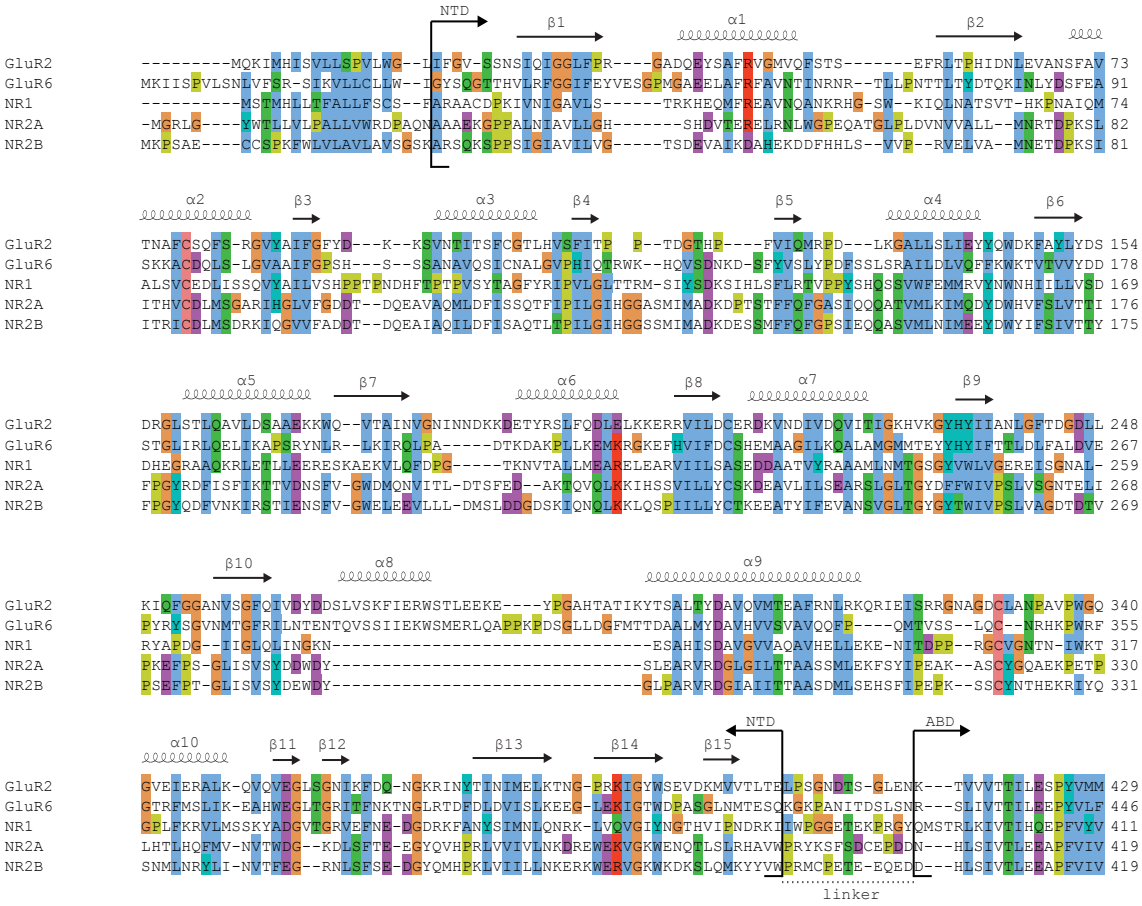


Figure 7.9 – Sequence alignment of AMPA GluR2, kainate GluR6 and NMDA NR1, NR2A and NR2B subunits, colored using the default scheme in jalview (Clamp et al., 2004). The indicated α-helices (coils) and β-strands (arrows) are from the X-ray structure of GluR2 NTD (pdb: 3H5V). The limits of the NTDs and ABDs are indicated by brackets.

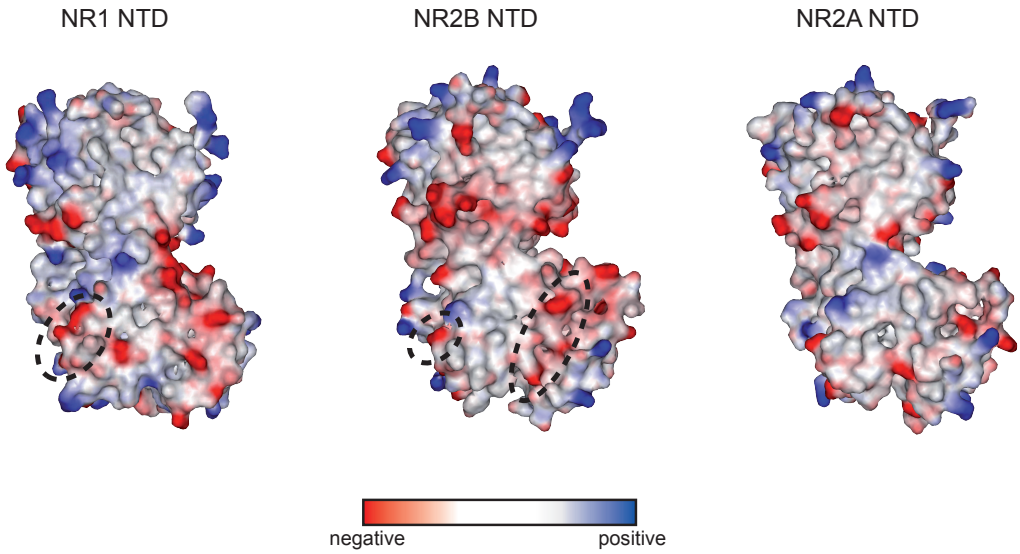


Figure 7.10 – Electrostatic potential surfaces of the homology models of NR1, NR2B and NR2A NTDs viewed from their putative dimerisation interface. Dashed circles represent the location of the acidic residues previously shown to control spermine sensitivity.

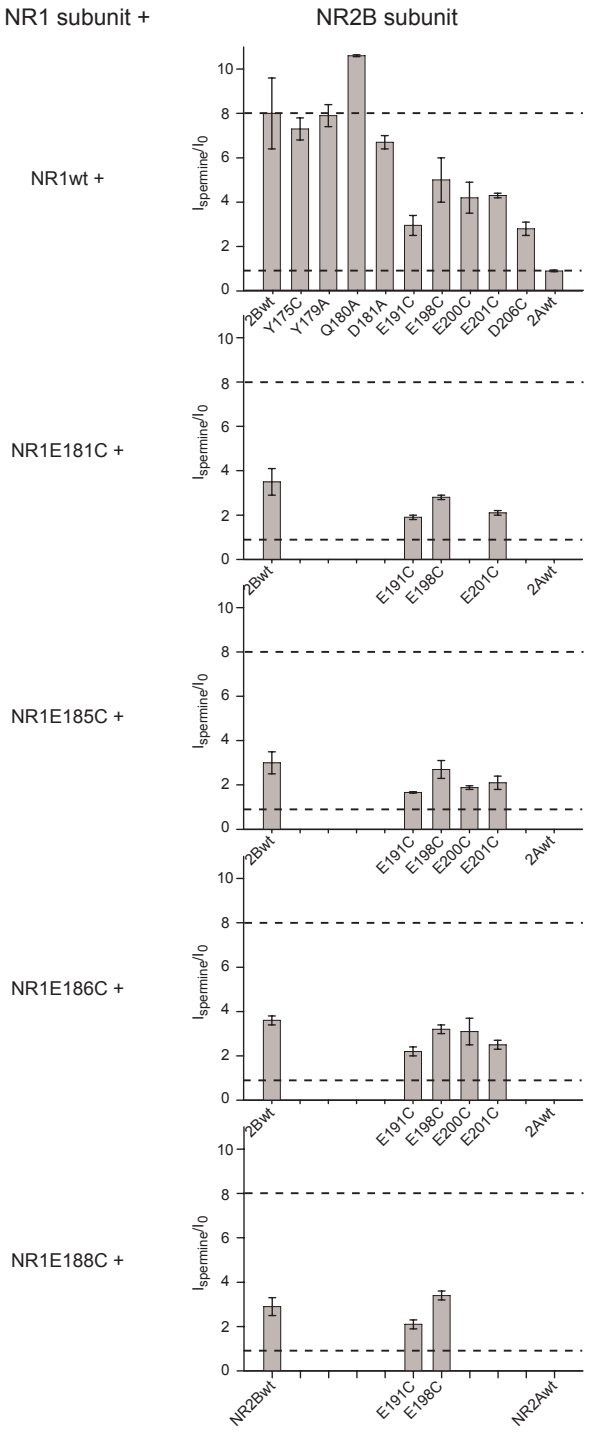


Figure 7.11 – Amplitudes of spermine-induced potentiations on different cysteine and alanine mutants. On all the graphs, the lower dashed line represents the amplitude of spermine-induced inhibition of NR1wt/NR2Awt receptors ($I_{spermine}/I_0 = 0.90 \pm 0.04$, $n = 17$), whereas the upper dashed line represents the amplitude of the spermine-induced potentiation of NR1wt/NR2Bwt receptors ($I_{spermine}/I_0 = 8.0 \pm 1.6$, $n = 16$).

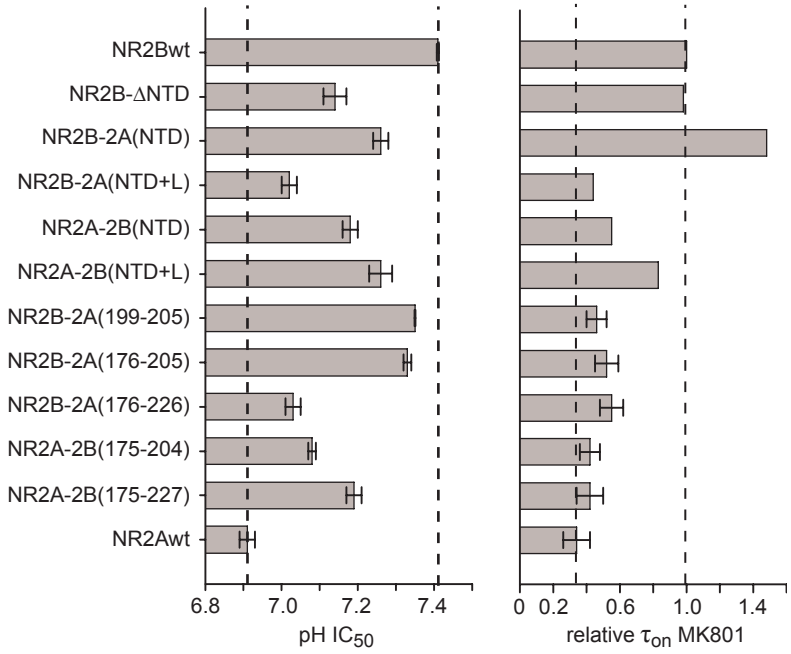


Figure 7.12 – Comparison of the pH IC_{50} and relative inhibition time constant by MK801 (relative τ_{on}MK801) of NMDA receptors incorporating NR1wt and different NR2A/NR2B chimeric subunits. The values for NMDA receptors containing the NR2B-ΔNTD, NR2B-2A(NTD), NR2B-2A(NTD+L), NR2A-2B(NTD) and NR2A-2B(NTD+L) are from Gielen et al. (2009). For the pH IC_{50} graph, the left dashed line represents the pH IC_{50} of NR1wt/NR2Awt receptors (pH $IC_{50} = 6.91 \pm 0.02$, $n = 11$), and the right dashed line the pH IC_{50} of NR1wt/NR2Bwt receptors (pH $IC_{50} = 7.41 \pm 0.03$, $n = 15$). For the relative τ_{on}MK801 graph, the left dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Awt receptors (relative τ_{on}MK801 $= 0.34 \pm 0.08$, $n = 26$), whereas the right dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Bwt receptors (relative τ_{on}MK801 $= 1$).

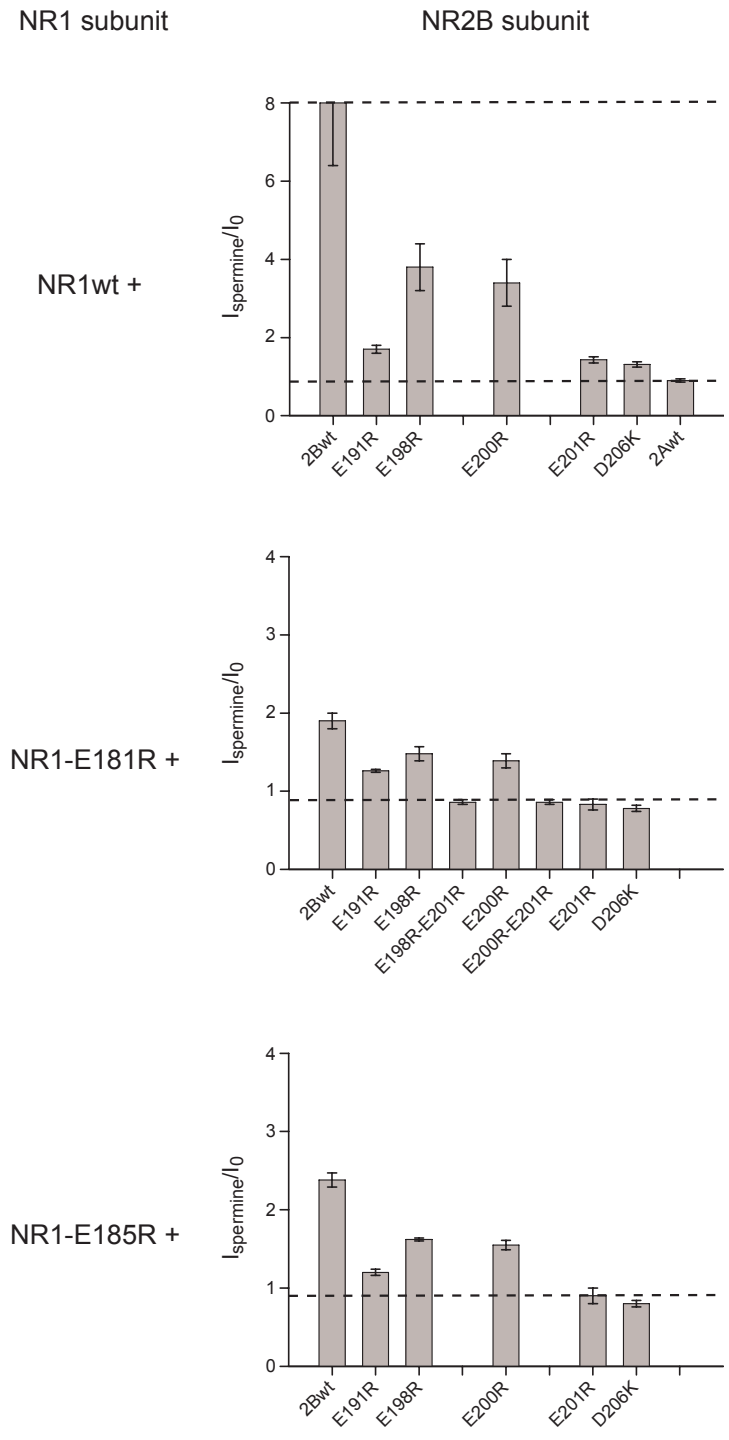


Figure 7.13 – Amplitudes of spermine-induced potentiations on different arginine and lysine mutants. On all the graphs, the lower dashed line represents the amplitude of spermine-induced inhibition of NR1wt/NR2Awt receptors ($I_{spermine}/I_0 = 0.90 \pm 0.04$, $n = 17$). On the first graph, the upper dashed line represents the amplitude of the spermine-induced potentiation of NR1wt/NR2Bwt receptors ($I_{spermine}/I_0 = 8.0 \pm 1.6$, $n = 16$).

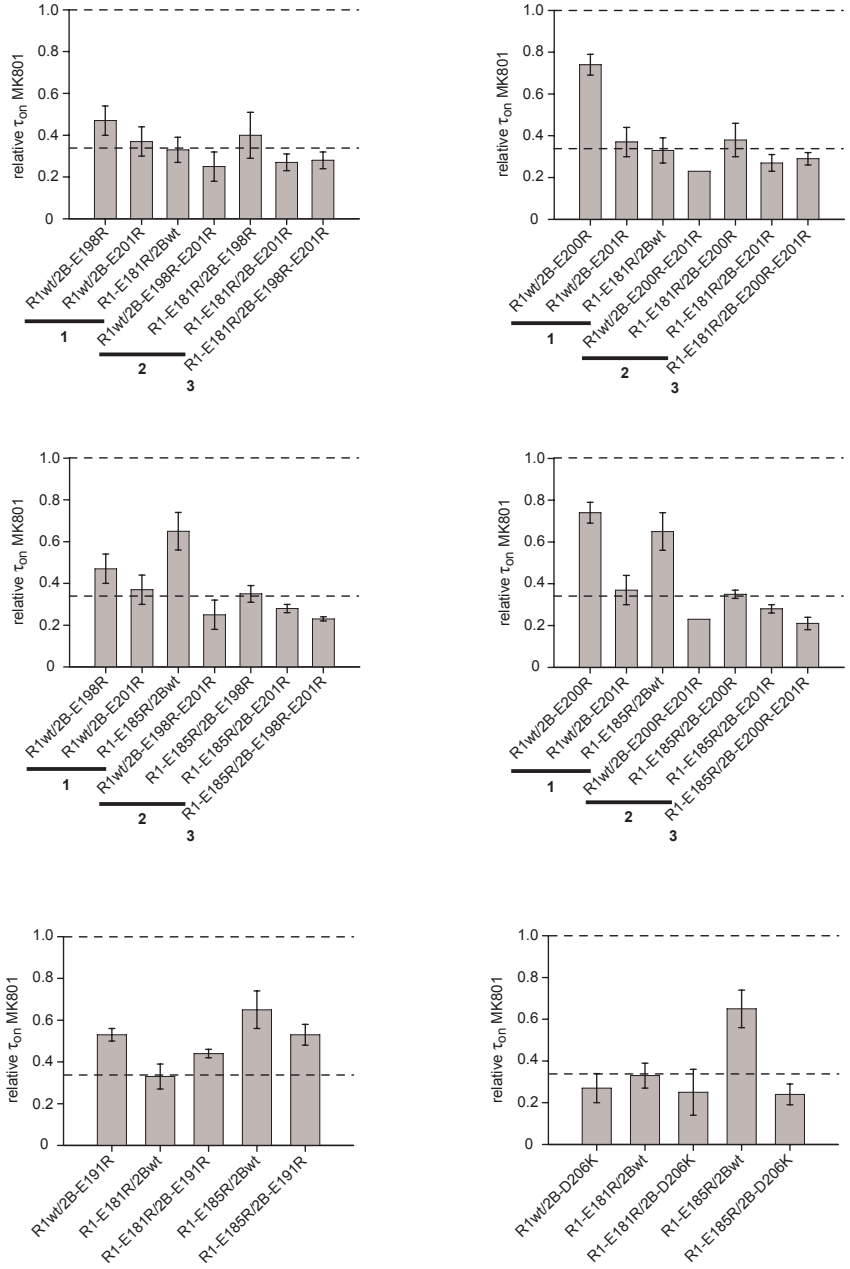


Figure 7.14 – Comparison of the relative τ_{on}MK801 of different NR1/NR2B constructs where one, two or three acidic residues were substituted by arginine (or lysine) residues. The lower dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Awt receptors (relative $\tau_{\text{on}}\text{MK801} = 0.34 \pm 0.08$, $n = 26$), whereas the upper dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Bwt receptors (relative $\tau_{\text{on}}\text{MK801} = 1$). The bold numbers indicate the single, double and triple arginine mutants in which 1, 2 or 3 acidic residues were mutated into an arginine. The constructs are regrouped by series of single, double and triple mutants at the same three positions.

7.2.4 Directly probing polyamine binding-site by the mean of photoreactive spermine compounds

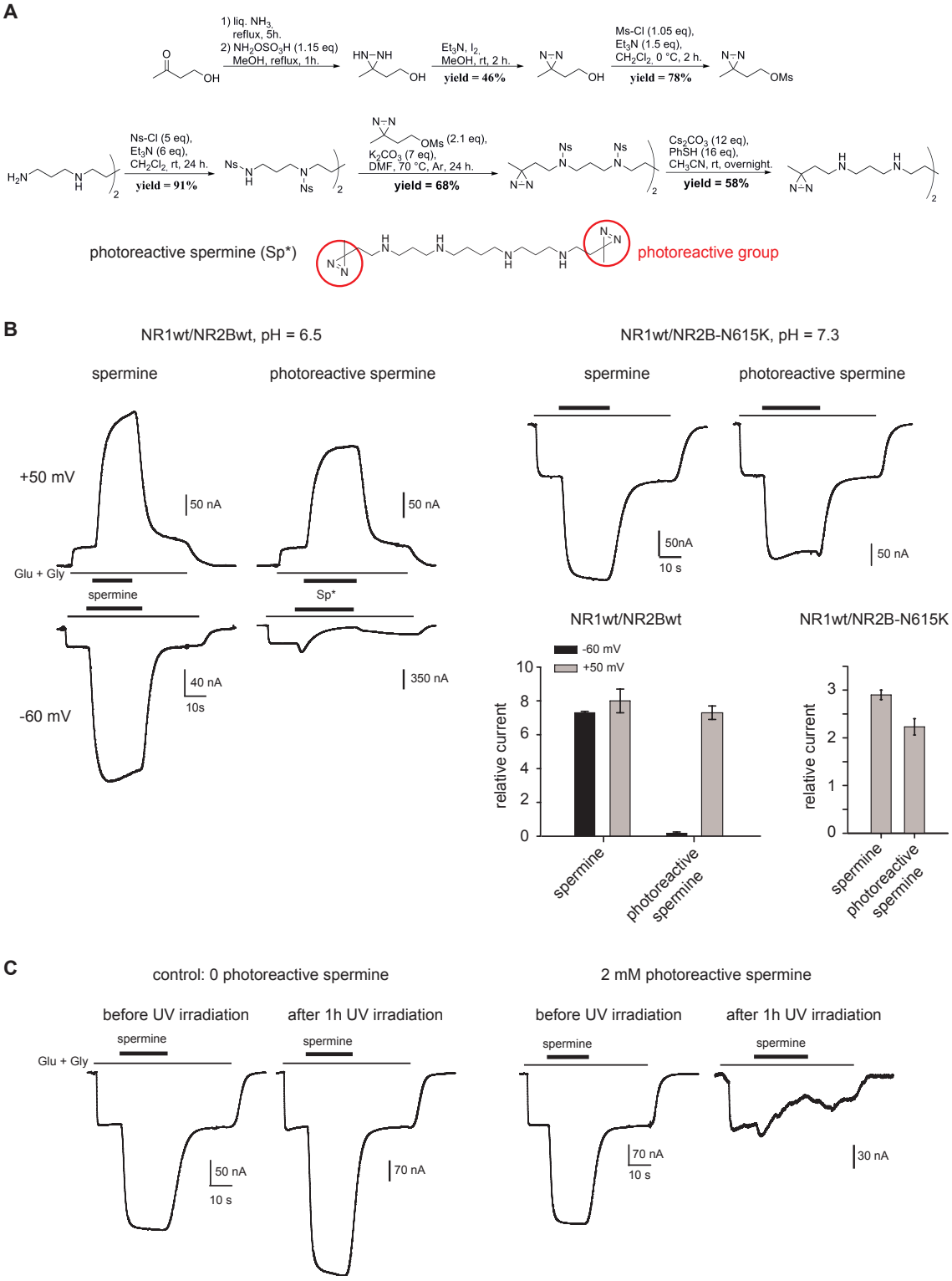
Our results indicating that spermine binds at the interface between NR1 and NR2B NTDs are essentially based on mutagenesis experiments. However, conclusions obtained from mutagenesis strategies must be drawn with caution. Indeed, when a mutation affects the sensitivity of a ligand, it is not clear whether it is due to the disruption of its binding-site (direct effect), or if it is due to a perturbation of a distant region of the protein that indirectly affects ligand sensitivity (Colquhoun, 1998). In our case, we wanted to show that polyamines do contact both NR1 and NR2B NTDs. Indeed, even if we have already shown that both NTDs are essential for spermine sensitivity, and although our results with chimeras between NR2A and NR2B subunits strongly indicate that the lobe II of NR2B NTD is part of spermine binding site, we cannot completely exclude the possibility that spermine binds to one domain, and that the other one exerts an allosteric interaction on spermine sensitivity.

To verify this, we decided use a stategy by which we could covalently link unmodified NR1 and NR2B subunits by the mean of a modified spermine derivative (contrary to cysteine-based crosslinking experiments that require cysteine substitution in the protein and can therefore bias the binding of the cysteine-reactive ligand). We therefore decided to perform photoaffinity labelling experiments with a spermine derivative containing two photoreactive groups (Sp*; Figure 7.15A). This derivative was synthesised in Mathieu Pucheault's team (CNRS and University of Rennes I). Under UV irradiation (365 nm), the methyl-diazirine group (the photoreactive group) is converted into a highly reactive carbene moiety that reacts with any residue located in its close proximity. We expected this spermine derivative to crosslink NR1 and NR2B subunits, one photoreactive moiety binding to NR1 NTD, and the other one to NR2B NTD.

Preliminary results

We first verified that Sp* could still potentiate NR1/NR2B receptors. When 200 μM of Sp* were applied at pH = 6.5 and at a holding potential of −60 mV on wild-type NR1/NR2B receptors, a strong inhibition of NMDAR currents was observed ($I_{compound}/I_0 = 0.17 \pm 0.08$, $n = 2$, vs 7.3 ± 0.8, $n = 4$, for spermine in the same series of experiments; Figure 7.15B). This inhibition was voltage-dependent, as it was absent at depolarised potential (Figure 7.15B). Indeed, at a holding potential of +50 mV, Sp* potentiated NMDAR currents to almost the same extent as spermine ($I_{compound}/I_0 = 7.3 \pm 0.4$, $n = 4$, for Sp* vs 8.0 ± 0.7, $n = 4$, for spermine). Consequently, addition of two photoreactive groups to the spermine molecule only slightly affected its sensitivity for polyamine potentiating site. However, Sp* seems to display a much higher affinity for the pore than spermine, as, at a holding potential of −60 mV and at pH = 6.5, the voltage-dependent inhibition could fully compensate for the huge potentiation seen at this pH. To prevent binding of Sp* in the pore, which could lead to undesired labelling at the level of the ion channel, we decided to use a receptor carrying a pore mutation that suppresses magnesium and zinc voltage-dependent blocks, NR1wt/NR2B-N615K (Paoletti et al., 1997; Wollmuth et al., 1998). As

Figure 7.15 – Preliminary results of photolabelling with a photoreactive spermine derivative, Sp*. In all electrophysiological recordings, spermine or Sp* were applied at a concentration of 200 μM. A, Synthetic scheme and chemical structure of the photoreactive spermine derivative, Sp*, bearing two photoreactive groups. This compound was synthesised by Emmanuel Baslé in Mathieu Pucheault's team, Molecular Chemistry and Photonics laboratory, University of Rennes I. Spm, spermine. B, Photoreactive spermine (Sp*) potentiates NR2B-containing receptors to a similar extent as spermine, but produces a huge voltage-dependent bloc. Left, Typical current traces obtained for NR1wt/NR2Bwt receptors at pH = 6.5 and at holding potentials of −60 mV and +50 mV. Note the important voltage-dependent block produced by Sp* at −60 mV. Right, Typical traces obtained for NR1wt/NR2B-N615K receptors at pH = 7.3 and at a holding potential of −60 mV. Bar graphs summarising the amplitudes of spermine- and Sp*-induced potentiations on NR1wt/NR2Bwt receptors at pH = 6.5 and NR1wt/NR2B-N615K receptors at pH = 7.3. C, After UV irradiation, Sp* irreversibly binds to spermine glycine-independent potentiating-site. Typical current traces obtained for NR1wt/NR2B-N615K receptors at pH = 7.3 before and after 1 h UV irradiation (365 nm) in Barth medium only (control) or in the presence of 2 mM Sp*. After 1h UV irradiation in the presence of Sp*, receptors are insensitive to spermine. Note also that after UV irradiation in the presence of Sp*, currents decreased a lot, probably due to an irreversible binding of Sp* in the pore of the receptors.


A
1) liq. NH3, reflux, 5h.
2) NH2OSO3H (1.15 eq) MeOH, reflux, 1h.
Et3N, I2, MeOH, rt, 2 h.
yield = 46%
Ms-Cl (1.05 eq), Et3N (1.5 eq), CH2Cl2, 0 °C, 2 h.
yield = 78%
Ns-Cl (5 eq), Et3N (6 eq), CH2Cl2, rt, 24 h.
yield = 91%
(2.1 eq), K2CO3 (7 eq), DMF, 70 °C, Ar, 24 h.
yield = 68%
Cs2CO3 (12 eq), PhSH (16 eq), CH3CN, rt, overnight.
yield = 58%
photoreactive spermine (Sp*)
photoreactive group
B
NR1wt/NR2Bwt, pH = 6.5
NR1wt/NR2B-N615K, pH = 7.3
spermine
photoreactive spermine
+50 mV
50 nA
Glu + Gly
Sp*
-60 mV
40 nA
10s
350 nA
50nA
10 s
NR1wt/NR2Bwt
NR1wt/NR2B-N615K
-60 mV
+50 mV
relative current
photoreactive spermine
C
control: 0 photoreactive spermine
2 mM photoreactive spermine
before UV irradiation
after 1h UV irradiation
70 nA
30 nA

shown in Figure 7.15B, substitution of N615 by a lysine strongly decreased Sp*-induced voltage-dependent inhibition. On these receptors, the sensitivities for spermine and Sp* were tested at pH = 7.3, because NR1wt/NR2B-N615K receptors had too small currents at pH = 6.5. Application of 200 μM of Sp* on NR1wt/NR2B-N615K receptors confirmed that this compound was almost as potent as spermine ($I_{compound}/I_0 = 2.2 \pm 0.2$, $n = 6$, for Sp* vs 2.9 ± 0.1, $n = 24$, for spermine). Sp* is therefore a potential candidate for photolabelling experiments.

Photolabelling experiments with Sp* were carried out according to the following protocol: oocytes were incubated in a 100 μL Barth solution (see Methods, Section 7.2.1 for the composition of the Barth medium) containing gentamycin (50 μg/μL), 50 μM D-AP5, to prevent opening of the ion channel and subsequent binding of Sp* in the pore, and supplemented or not with 2 mM photoreactive Sp*. Oocytes were then subjected to UV irradiation during one hour in a plastic 96-well plate (without the cap to avoid UV absorption by the plastic), at a distance of $\sim$ 1 cm, with a 365 nm lamp (Vilber Lourmat, VL-6LC, 6 W). Oocytes were then washed in Barth medium to remove any irreversible labelling.

To verify that Sp* had actually irreversibly bound the NR2B-specific polyamine potentiating site, spermine sensitivity of NR1wt/NR2B-N615K receptors was tested before and after UV irradiation. The results are shown in Figure 7.15C. When oocytes expressing NR1wt/NR2B-N615K receptors were irradiated in a medium that did not contain Sp*, almost no change of spermine sensitivity was observed ($I_{spermine}/I_0 = 2.97 \pm 0.05$, $n = 6$, before irradiation and 3.1 ± 0.4, $n = 6$, after irradiation). However, spermine potentiation was abolished when oocytes were irradiated during 1h in a solution containing 2 mM of Sp* (Figure 7.15C). This result thus strongly suggests that Sp* has irreversibly bound spermine potentiating site. It is also worth noting that the NMDAR currents were strongly decreased after photolabelling with Sp*, which could be due to an irreversible binding of the molecule in the pore, despite all our precautions to avoid this effect.

Western blot analysis were also done after photolabelling of NR1wt/NR2B-N615K receptors, to see if the bi-functional spermine derivative Sp* could crosslink NR1 and NR2B subunits. However, no such NR1/NR2B heterodimer could be observed in our Western blots, indicating that this molecule does not crosslink NR1 and NR2B subunits (data not shown). Sp* contains photoreactive groups at its two extremities. It is thus conceivable that Sp* does bind at the NTD lobe II dimer interface between NR1 and NR2B subunits, but that its extremities contact the same subunit, the other subunit interacting with the central part of the molecule. In that case, no crosslinking would be observed. Still, if Sp* cannot crosslink NR1 and NR2B subunits, we have shown that Sp* could irreversibly bind to the polyamine glycine-independent and voltage-independent potentiating site. This molecule is therefore a promising tool to study this site (see below).

Future experiments: using photoreactive spermine derivatives to determine the precise residues interacting with spermine

We next decided to use photoreactive spermine derivatives to determine precisely which residues form polyamine glycine-independent and voltage-independent potentiating site. Indeed, the technique of photoaffinity labelling has been widely used in determining the precise location of the binding site of a ligand. For instance, this technique was used to map the binding site of the polyamine-containing toxin MR44 in the nicotinic acetylcholine receptor (Bixel et al., 2001).

In our case, the strategy is the following: oocytes expressing wt NR1/NR2B receptors or NR1-N615K/NR2B receptors are irradiated at 365 nm in a solution containing or not the photoreactive spermine derivative. Then, NMDAR subunits (NR1 or NR2B) are purified (see below). Intact subunits (irradiated in a medium without any photoreactive compound) and modified subunits (irradiated in a medium containing the photoreactive compound) are submitted to proteolysis by trypsin, leading to peptides of different sizes. The sequence of each peptide is determined by mass spectrometry by comparison of its

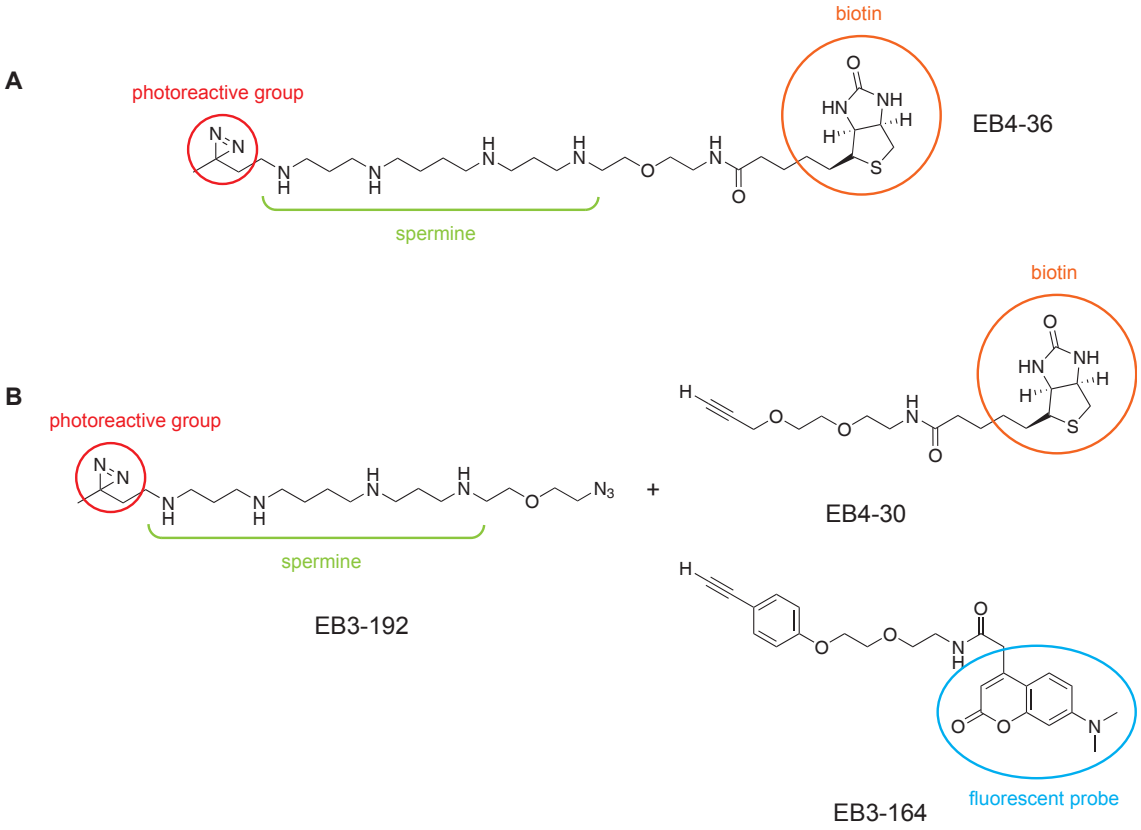


Figure 7.16 – New photoreactive spermine derivatives containing three functional groups: one group that drives the affinity for the binding-site (spermine), one group for covalent linking to the receptor (photoreactive group) and one group for the detection of the ligand-protein adduct (biotin or fluorescent probe). These molecules were synthesised by Emmanuel Baslé in Mathieu Pucheault's team, Molecular Chemistry and Photonics laboratory, CNRS and University of Rennes I. A, Tri-functional spermine derivative with biotin. B, Two-step strategy: first, covalent linking of a bifunctionnal, photoreactive spermine derivative to the receptor, then coupling of the ligand-protein adduct to the "detection group", biotin or fluorescent probe by "click" chemistry.

mass with the theoretical cleavage profile of the subunit sequence by trysin (which cleaves the protein only after an arginine or a lysine). Then, the masses of the different peptides are compared between the intact and the modified subunits. The peptides that have reacted with the spermine derivative have their masses changed between the intact and the modified subunits.

The mass spectrometry experiments require prior purification of the NMDAR receptors expressed in Xenopus oocytes. Several purification strategies can be envisaged. After photolabelling with Sp*, the NR1 and NR2B-N615K subunits can be individually purified by immunoprecipitation with an antibody against NR1 or NR2B. The problem of this method is that we have to do two purifications, one per subunit, because we don't know which subunit, NR1 or NR2B, has reacted with Sp*. To counteract this problem, Matthieu Pucheault and colleagues have designed new photoreactive species, called trifuntional compounds, which posses three functional groups (Figure 7.16):

- one group that drives the affinity for the binding site, in our case a spermine moiety;
- one group for covalent linking to the protein, in our case a methyl-diazirine photoreactive group;
- one group that enables the detection of the protein-ligand adduct. In our case the "detection group" can either be a biotin moiety, which enables us to purify the protein-ligand adduct with a streptavidin column, or a fluorescent moiety.

These trifuntional spermine derivatives are very interesting tools for mapping the spermine binding site on NMDA receptors. Indeed, once they have bound the receptors, we can directly purify the protein-ligand adduct, without having to guess which subunit of the NMDAR has reacted with the compound. However, we first have to verify that the diazirine-spermine-biotin compound (EB4-36 in Figure 7.16) can still bind to the polyamine glycine-independent and voltage-independent potentiating site. If such is not the case, we can then use another strategy, which consists of first using a spermine derivative containing a photoreactive group at one extremity and a chemical (non photoreactive)

reactive group (N_3) at the other extremity (EB3-192 in Figure 7.16). As Sp* and EB3-192 have similar chemical structures, EB3-192 is expected to have almost the same affinity as spermine for the polyamine potentiating site. Then, after labelling of the receptor by EB3-192, the "detection group" can be attached to EB3-192 by copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition (known under the generic term of "click chemistry"; Rostovtsev et al., 2002).

7.3 Discussion

In the present work, we have determined the binding site and the mechanism of polyamines acting in a glycine-independent and voltage-independent manner. Moreover, our results explain in part the origin of the selectivity of this polyamine-induced potentiation towards receptors containing the NR2B subunit. More generally, our work gives insights into the arrangement of the NTD dimers and provides novel evidence that the N-terminal region of these receptors is the major locus for subunit-specific allosteric regulation of NMDAR ion channels.

Former mutagenesis studies aiming at determining spermine potentiating site were hampered by the fact that the mutations that reduce spermine sensitivity also reduce pH sensitivity. It was therefore difficult to discriminate between a direct effect of the mutations on spermine binding site and an indirect effect, through the modification of pH sensitivity. To by-pass this problem, we decided to work at acidic pH, at which the variability of pH inhibition between mutant receptors is decreased. This approach also presents other advantages. Indeed, at pH = 6.5, spermine-induced potentiation of wild-type NR1/NR2B receptors is very large, making it easier to see differences of spermine sensitivity between mutants. Furthermore, under application of a saturating concentration of glycine, spermine also induces a voltage-dependent inhibition of NMDARs that can be suppressed only by working at depolarised potentials. Because of the very large spermine-induced potentiation observed at pH = 6.5, we can work at hyperpolarised potential and have a minimal contribution of the "contaminating" voltage-dependent block in the the currents measured in the presence of spermine.

7.3.1 Polyamines bind at the interface between NR1 and NR2B subunits

By using chimeric receptors in which the NR1 or the NR2B subunit was deleted for its NTD, we have shown that the presence of both NR1 and NR2B NTDs are essential for spermine sensitivity. Moreover, chimeras between NR2A and NR2B subunits located

spermine binding site in the β6-β8 region of NR2B NTD, the region forming the putative lobe II dimer interface between NTDs. The fact that residues of the β6-β8 region of NR1 NTD also controlled spermine sensitivity and that cysteines introduced in the β6-β8 regions of NR1 and NR2B NTDs could be crosslinked indicates a polyamine potentiating site located at the dimer interface between NR1 and NR2B NTDs. Our results therefore confirm previous mutagenesis studies that had suggested that polyamines could bind to the NTDs of NR1 and NR2B (Gallagher et al., 1997; Masuko et al., 1999). They also give functional evidence to the work of Huggins and Grant (2005), who proposed, on the basis of molecular modelling studies, that spermine could bind at the interface between NR1 and NR2B NTDs. Finally, our work is in agreement with the work of Han et al. (2008), who showed that spermine could bind to isolated NTDs of NR1 and NR2B subunits with dissociation constants (K_d) of 19 μM and 33 μM, respectively. However, they also found that the isolated NTD of NR2A could bind spermine, with a lower affinity (K_d = 140 μM), whereas we have proposed, based on the fact that even at very acidic pH spermine could not potentiate NR2A-containing receptors, that NR1/NR2A receptors do not contain the polyamine glycine-independent and voltage-independent potentiating site. Han et al. (2008) attributed this binding of spermine on NR2A and NR2B NTDs to the glycine-dependent potentiating effect of polyamines, because this occurs on both NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors and because the K_d found for spermine binding on isolated NTDs is constitent with the IC_{50}s of spermine for the glycine-dependent potentiation of NR2A- and NR2B-containing NMDARs (Han et al., 2008). It is thus possible that the NTDs of NR1 and NR2 subunits carry both polyamine glycine-dependent and glycine-independent potentiating sites.

Chimeras between the regions of NR2A and NR2B involved in the lobe II NTD dimer interface, the β6-β8 regions, suggested an important role of this region in the subtype selectivity of polyamine potentiation. Indeed, transferring the β6-β8 region of NR2B NTD into NR2A NTD converted the spermine-insensitive NR1/NR2A receptors

into spermine-sensitive receptors. Selectivity of spermine for NR1/NR2B receptors compared to NR1/NR2A receptors is likely to stem from two reasons:

- The electrostatic potential of the β6-β8 region of the NR2 subunit. The β6-β8 region of NR2A NTD is less rich in acidic residues than the one of NR2B NTD, as exemplified by the electrostatic potential surfaces of both NTDs (Figure S2). In particular, NR2B-E200 and -E201 are replaced by neutral residues (glutamine and asparagine) on NR2A NTD.
- The structure of the β6-β8 region. Indeed, NR2A and NR2B β6-β8 regions differ by their β7-α6 loop, which is two residues longer in NR2B. As the transfer of the region between NR2B-L205 and NR2B-I227 is essential for conferring spermine sensitivity to NR1/NR2A receptors, we can make the assumption that, in addition to the supplementary negative charge carried by the β7-α6 loop of NR2B compared to NR2A, its structure may also play a role in the determination of spermine sensitivity.

These two reasons may also explain why spermine does not exert any glycine-independent and voltage-independent potentiation on NR2C and NR2D receptors. Indeed, the β6-β8 regions of these subunits are poor in negatively-charged residues, and therefore cannot form a binding site for spermine. However, NMDARs containing an NR2A subunit with the β6-β8 region of NR2B have a low affinity for spermine compared to the receptors containing an NR2A subunit with the full NTD of NR2B, indicating that other determinants on the NTD may also be necessary for full polyamine sensitivity. The linker connecting the ABD to the NTD has also an important role, as it determines the maximal potentiation at saturating concentrations of spermine. Rather than directly participating in polyamine binding-site, this linker may have a transduction role, as also suggested by Gielen et al. (2009).

The NTDs of NMDARs share structural similarity with the bacterial periplasmic protein leucine/isoleucine/valine-binding protein (O'Hara et al., 1993; Masuko et al., 1999; Paoletti et al., 2000) and other domains that belong to the same family, such as the

glutamate-binding domain of metabotropic glutamate receptors (O'Hara et al., 1993; Kunishima et al., 2000) or the extracellular domain of the atrial natriuretic peptide receptors (ANPR; He et al., 2001). Among NMDARs, this is the first time that a modulatory site is found at the interface between two subunits, the other allosteric modulators of known binding sites, zinc and ifenprodil derivatives, binding inside a single domain. This is reminiscent of the common properties of the proteins of the LIVBP family, in which the ligands mostly bind in the large interlobe cleft delimited by the two lobes of these proteins. However, all transmembrane receptors containing extracellular LIVBP-like domains are organised as dimers, and some of them present binding sites for ligands at their dimer interface (voir Chapitre 2, Section 2.2, page 76). This is the case of the NPR-C receptor, from the ANPR family, which binds cyclic natriuretic peptides at the dimer interface between its extracellular domains (He et al., 2001). Under a certain configuration, the dimer interface of the glutamate-binding domains of mGluR1 can also form a binding site for the Gd^{3+} ion (Tsuchiya et al., 2002). In these two receptors, the cyclic natriuretic peptides and Gd^{3+} bind at the lobe II dimer interface, in the region corresponding to the β6-β8 region of NMDARs. The fact that the lobe II dimer interface between two LIVBP-like domains can form a binding site for ligands is therefore also likely to be a conserved property of certain members of the LIVBP family.

7.3.2 NR1 and NR2B NTDs are likely to form heterodimers

Another strong result of our work is that NR1 and NR2B NTDs are likely to form heterodimers. Although such an arrangement had already been proposed by Sobolevsky et al. (2009) for NR1/NR2A receptors, it had never been clearly demonstrated before. By crosslinking cysteines introduced in the putative dimer interface of NR1 and NR2B NTDs with short MTS reagents, we demonstrated that NR1 and NR2B NTDs most likely form heterodimers. However, our conclusions must be taken with caution for the moment, because data about some control conditions are lacking in our crosslinking experiments.

In particular, we lack the controls in the Western blot revealed by an antibody against NR2B, to confirm that the band we attribute to a heterodimer for the NR1-E181C/NR2B-E201C cysteine couple is not present in the control conditions. If our conclusions are true, these crosslinking experiments also give insights into the dimeric organisation of a dimer of NMDAR NTDs. Studies of iGluR NTDs have so far been hamperd by a lack of high resolution structural data. Recently, crystallographic structures of AMPA and kainate NTD dimers came out (GluR2 and GluR6 subunits; Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). A crystallographic structure of NR2B NTD has also been released (Karakas et al., 2009), but the dimer organisation of NMDAR NTDs is still unknown. To have an idea of this organisation, we have built a homology model of NR1 and NR2B NTDs based on the crystallographic structures of GluR6 and GluR2 NTD dimers. However, these templates may not constitute *a priori* the best one for the modeling of an NMDAR NTD dimer for two reasons (Karakas et al., 2009):

- NR2B NTD in its closed-cleft conformation has a 50° twist between its two lobes. Among all the proteins of the LIVBP family, such a twist has only been observed in NR2B NTD and it prevents the dimerisation of two domains as observed in AMPA and kainate NTDs or in the glutamate-binding domains of mGluR1.
- AMPA and kainate NTDs possess at their lobe II dimer interface a patch of hydrophobic residues, which explain the important dimerisation interface at the level of the lobes II compared to the dimer of mGluR1 ABDs (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). On the contrary, NR1 and NR2B NTDs both possess negatively charged residues at their lobe II dimer interface. The interface between NR1 and NR2B NTD lobes II is therfore unlikely to be similar to the one of AMPA and kainate receptors, but would much more look like the lobe II dimer interface of mGluR1 ABDs, which also contain charged residues at their lobe II dimer interface.

Despite these unfavourable data about a similarity between non-NMDA and NMDA NTD dimers, our homology model based on the crystallographic structures of GluR2 and GluR6 seems to be coherent with our crosslinking data. Indeed, in our homology model, the distances between cysteines introduced at the NR1-E181 and NR2B-E198 positions, on the one hand, and at the NR1-E181 and NR2B-E201C positions, on the other hand, are 8.5 Å and 5 Å, respectively. These distances are comparable to the length of the MTS compound M2M (7.7 Å) that could crosslink the two pairs of cysteines. These results therefore suggest that an NR1/NR2B NTD dimer could adopt a conformation with its lobes II in close apposition, similarly to AMPA and kainate NTDs. However, as maintaining NR1 and NR2B NTD lobes II together increases the activity of NMDARs, this conformation may not be the most stable one under basal conditions.

7.3.3 Mechanism of positive allosteric modulation of NMDARs and modulatory role of NMDAR NTDs

Modulation of the activity of NMDARs by the NTDs has been widely studied at the level of the single domain. Accordingly, it has been shown that spontaneous or antagonist-induced closure of the NTD of the NR2 subunit induces entry of NMDARs into a inactive state, called "desensitised" because it resembles the desensitised state of AMPA and kainate receptors (Mayer, 2006; Gielen et al., 2008, 2009). Our study on positive allosteric modulation of NMDARs enabled us to propose a mechanism for the modulation of NMDAR activity by NTDs at the level of the dimer.

From our three results: (i) maintaining NR1 and NR2B NTD lobes II together potentiates NMDAR currents, (ii) introducing positive charges in the NTD lobe II dimer interface increases the Po of NR1/NR2B receptors and (iii) spermine favours an open-cleft conformation of NR2B NTD, we can propose a mechanism for polyamine action on NMDARs and, more generally, a mechanism of allosteric modulation by NTDs of NMDARs containing the NR2B subunit (Figure 7.8). Gielen et al. (2009) have proposed that,

under an application of saturating concentrations of agonists, NMDARs can oscillate between two states: an active state and a "desensitised" state. The open probability of the receptor is determined by the equilibrium between the active state and the "desensitised" state. Our results indicate that, in the active state, the NTD dimer is in an orientation in which NR1 and NR2B NTDs contact each other and that resembles the "active" orientation (A) of mGluR ABD dimer, with NR2B NTD in an open-cleft conformation. By using the nomenclature of Kunishima et al. (2000), we can call this state "open/A". In the desensitized state, NR1 and NR2B NTD lobes II are far from each other, resembling the "resting" orientation (R) of mGluR ABD dimers, with NR2B NTD in a closed-cleft conformation. We can thus call this configuration "closed/R" (Fig 7). We can imagine that the increase in distance between the lobes II of NR1 and NR2B NTDs in the "closed/R" configuration exerts a tension on the NTD-ABD linkers and induces breaking of the ABD dimer interface, thus triggering closure of the ion channel, as already proposed (Mayer, 2006; Gielen et al., 2008). Electrostatic repulsion between negative charges located in the NTD lobe II dimer interface that face each other in the "open/A" configuration favours the equilibrium towards the "closed/R" configuration, inducing entry of NMDARs into the "desensitized" state (Figure 7.8). This mechanism most likely accounts for the low Po of NMDARs containing the NR2B subunit. Positively-charged polyamines, by shielding the negative charges of the NTD lobe II dimer interface, convert electrostatic repulsion into electrostatic attraction and favour the "open/A" configuration. As the "open/A" corresponds to the active state of NR1/NR2B receptors, polyamines therefore induce potentiation of NMDAR activity.

The NTD region of the NR2 subunit has been shown to be fundamental in the control of the differences of activity (channel open probability) between NMDAR subtypes (Gielen et al., 2009; Yuan et al., 2009). Two characteristics of the NTD region were proposed to explain this modulatory role of the NTD of the NR2 subunit:

– The relative stability of the closed-cleft conformation of the NTD of the NR2 subunit

compared to the open-cleft conformation. For instance, Gielen et al. (2009) have shown that mutation into a serine or a cysteine of the hinge residue Y282 in NR2B NTD decreased NMDAR activity, probably by favouring closure of NR2B NTD.

– The nature of the linker connecting the NTD of the NR2 subunit to the ABD. This linker has been proposed to have a role in the transduction of the conformational changes of the NTD to the gating core of NMDARs.

These two characteristics explain the role of the NTDs at the level of the single subunit. In our work, we have highlighted a third feature of the NTD region that controls the open probability of NR2B-containing receptors, the nature of the NTD lobe II dimer interface. As discussed before, the electrostatic repulsion between the negatively-charged lobes II of NR1 and NR2B NTDs most likely explains the low Po of NR1/NR2B receptors. Based on this mechanism, the higher Po of NMDARs containing the NR2A subunit might be explained in part by a lower electrostatic repulsion between the lobes II of NR1 and NR2A NTDs, because the β6-β8 region of NR2A NTD is less rich in negatively charged residues. However, NMDARs containing NR2A subunits with the β6-β8 region of NR2B or even the full NTD of NR2B have a Po close to wt NR1/NR2A receptors. On NMDARs containing the NR2A subunits, the two characteristics discussed above (open-closed equilibrium of NR2A NTD and NR2A NTD-ABD linker) might be dominant in the control of the open-probability. As a consequence, our mechanism which propose a fundamental role of the NTD lobe II dimer interface in the control of the activity of NR1/NR2B receptors may not be applicable to other NMDAR subtypes.

Besides its role in the control of the Po of NR1/NR2B receptors, the β6-β8 region of the NTD NR1 and NR2 subunits has also an important role in the control of the pH sensitivity of NMDARs. Indeed mutations of acidic residues located in this region decreased pH sensitivity of NR1/NR2B receptors (Masuko et al., 1999). Moreover, exchanging the β6-β8 regions between NR2B and NR2A NTDs could also exchange the pH sensitivities of the receptors (Figure S4; pH $IC_{50} = 7.03 \pm 0.02$ for NR1wt/NR2B-2A(176-226) receptors

compared to 6.91 ± 0.02 for NR1wt/NR2Awt receptors; and pH $IC_{50} = 7.19 \pm 0.02$ for NR1wt/NR2A-2B(175-227) receptors compared to 7.41 ± 0.01 for NR1wt/NR2Bwt receptors and 7.18 ± 0.02 for NR1wt/NR2A-2B(NTD) receptors). This region is therefore a determinant of the differences of pH sensitivities between NMDARs containing the NR2A and the NR2B subunits. The location of the "proton sensor" of NMDARs has not been determined yet, but it is thought to be located close to the gate of the receptor (Low et al., 2003). Our results indicate that the lobe II dimer interface of NR1 and NR2B NTDs may also constitute a potential proton sensor. Gielen et al. (2008) have shown that the ABD dimer interface is also a key determinant in the control of NMDAR pH sensitivity, a perturbation of this interface increasing pH sensitivity. Our work and the one of Gielen et al. (2008) thus highlight the key role of subunit interfaces in the control of pH sensitivity, and more generally in the control of NMDAR activity.

7.3.4 Does NR1 NTD undergo conformational changes during the transition between the active and "desensitised" states?

Our work has shown that the dimer of NR1 and NR2B NTDs can undergo inter- (A and R orientations) and intra-protomer conformational changes (opening and closure and the NTDs) during NMDAR activity. However, if the intraprotomer conformational changes are relatively well understood for the NTD of the NR2B subunit, nothing is known about the conformation of the NTD of the NR1 subunit. Deletion of NR1 NTD on NR1/NR2B-YFP receptors modestly increased the open probability of the receptors, as indicated by the relative time constant of inhibition by MK801 (relative τ_{on}MK801 $= 1.1 \pm 0.1$, $n = 5$, for NR1-ΔNTD/NR2B-YFP receptors vs τ_{on}MK801 $= 1.5 \pm 0.2$, $n = 4$, for NR1wt/NR2B-YFP receptors; Figure 7.17). These results therfore suggest that NR1 NTD exerts some influence on the activity of NR1/NR2B receptors.

To probe for a potential role of spontaneous oscillations of NR1 NTD on NMDAR activity, we used the same approach as Gielen et al. (2009). The equivalent residue of NR2B-

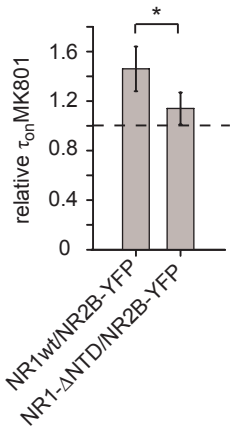


Figure 7.17 – Relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2B-YFP and NR1-ΔNTD/NR2B-YFP receptors. The dashed line represents the relative τ_{on}MK801 of NR1wt/NR2Bwt receptors. *, $p < 0.05$. These results were obtained in our lab by Shujia Zhu.

Y282 on NR1 NTD, L271, was sustituted by a cysteine. This hinge residue is putatively located deep in the interlobe cleft of NR1 NTD, and modification of the introduced cysteine by bulky thiol-reactive MTS compounds is expected to lock the NTD open, as was the case for NR2B NTD. We used three MTS compounds of increasing sizes, 2-aminoethylmethanethiosulfonate (MTSEA), 2-(trimethylammonium)ethylmethanethiosulfonate (MTSET) and MTSPtrEA. None of these MTS could induce an irreversible effect on the activity of either NR1-L271C/NR2Bwt or NR1-L271C/NR2Awt receptors that was different from the effect on the control NR1-L271S/NR2Bwt and NR1-L271S/NR2Awt receptors (Figure 7.18). Two reasons could explain this absence of effect: (i) The introduced cysteine was not accessible and was therefore not modified by MTS compounds; (ii) the introduced cysteine was accessible but its modification with MTS reagents did not induce any modification of NMDAR activity.

To try to eliminate the first hypothesis, we introduced a cysteine at a position less buried in NR1 NTD interlobe cleft, T122, which is the residue equivalent to H127 in NR2B NTD. Again, modification of NR1-T122C/NR2Bwt receptors and NR1-T122C/NR2Awt receptors failed to induce an irreversible effect on NMDAR activity (Figure 7.18). These results suggest that NR1 NTD does not undergo any conformational change, being either

always closed (the residues of the interlobe cleft being thus inaccessible to the solvent), or always open (MTS coumpounds react with the introduced cysteine, but, as the domain is always open, do not modify the conformation of the domain). On mGluRs and $GABA_B$ receptors, it has been shown that the closure of only one domain of a dimer is sufficient to induce an activation of the receptors (Kniazeff et al., 2004a,b). It is therefore conceivable that only the NTD of the NR2 subunit, and not NR1 NTD, undergoes conformational changes. However, as no crystallographic structure of the NTD of the NR1 subunit has been released, we also cannot rule out the fact that the introduced cysteines at positions T122 and L271 did not react with the MTS compounds because they don't point towards the interlobe cleft, as expected, but rather point towards the inner core of the domain. Further investigation need therefore to be carried out to determine the influence of NR1 NTD on NMDAR activity.

7.3.5 The exon 5: an intrinsic positive modulator acting at polyamine potentiating site?

The NR1 subunit exists as eight splice variants obtained from three exons: exon 5 on the N-terminal domain and exons 21 and 22 in the C-terminal domain. NR1 subunits containing exon 5, NR1-1b subunits, posses a supplementary loop of 22 residues at the bottom of the lobe II of their NTD (Figure 7.19). The site of insertion of this supplementary loop is located in the β6-β8 region of NR1 NTD, very close to the acidic residues that control spermine sensitivity (Figure 7.19B). Insertion of exon 5 on NR1 NTD has several functional consequences. It has been indeed shown to decrease the pH sensitivity of every subtype of NMDA receptors (Traynelis et al., 1995). Exon 5 loop is rich in positively-charged residues (see Figure 7.19A) and it has therefore been proposed that this loop shields the acidic residues that probably form the "proton sensor" (Traynelis et al., 1995). As a consequence of its effect on proton sensitivity, insertion of exon 5 also decreases the sensitivity of NR2A- and NR2B-containing NMDARs for zinc (Traynelis

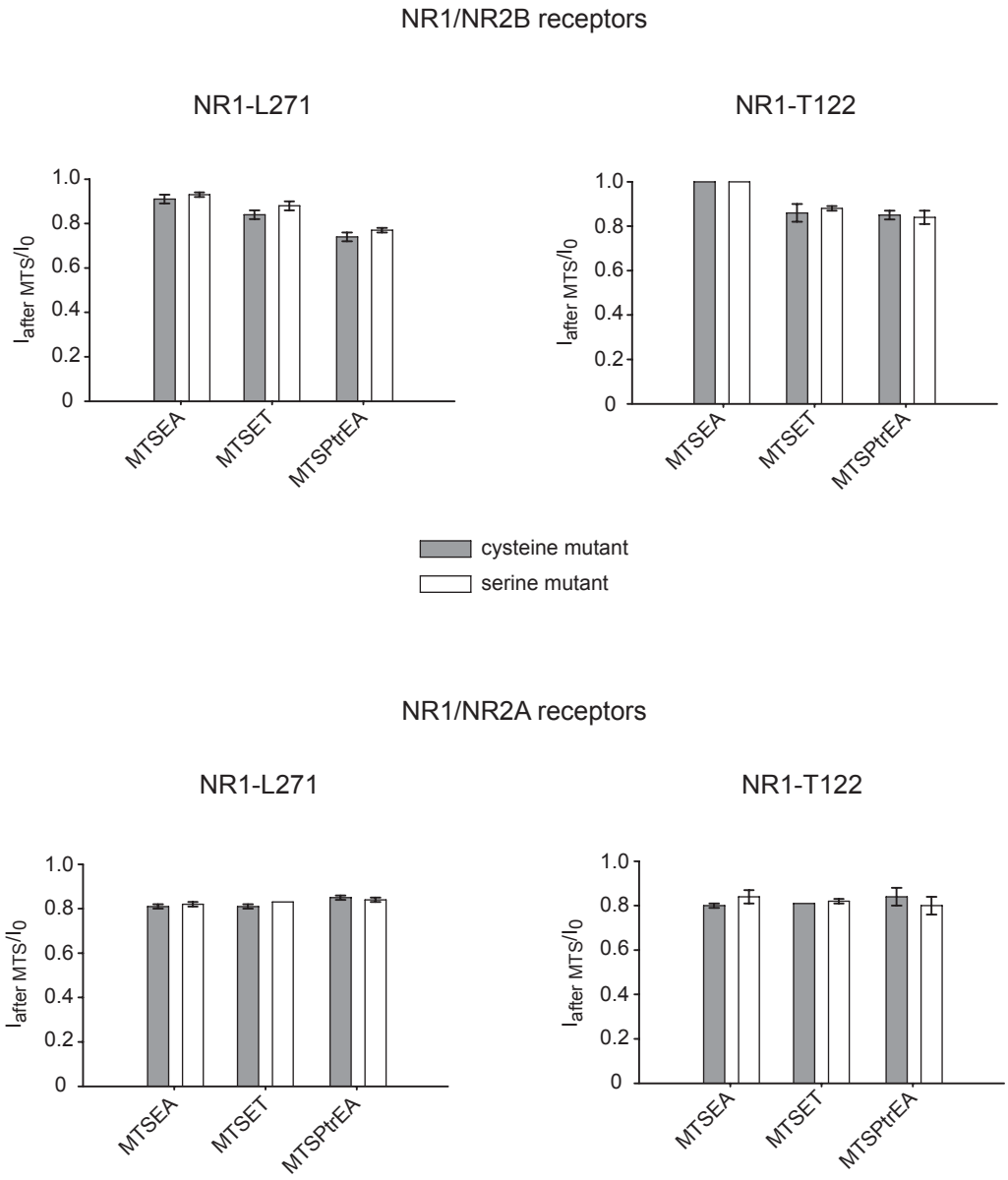


Figure 7.18 – Modification by MTS of cysteines introduced in its putative interlobe cleft have no effect on NMDAR activity. MTS compounds were applied at a concentration of 200 μM. $I_{afterMTS}/I_0$ represents the ratio of the NMDAR current measured after application and washing of MTS on the basal agonist current.

et al., 1998), which have been shown to inhibit NMDARs through a increase in the pH sensitivity of NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors (Traynelis et al., 1998; Choi and Lipton, 1999; Low et al., 2000; this effect of zinc on pH sensitivity has been clearly demonstrated on NR1/NR2A receptors, but it is more controversial for NR1/NR2B receptors; see Section 3.2.3).

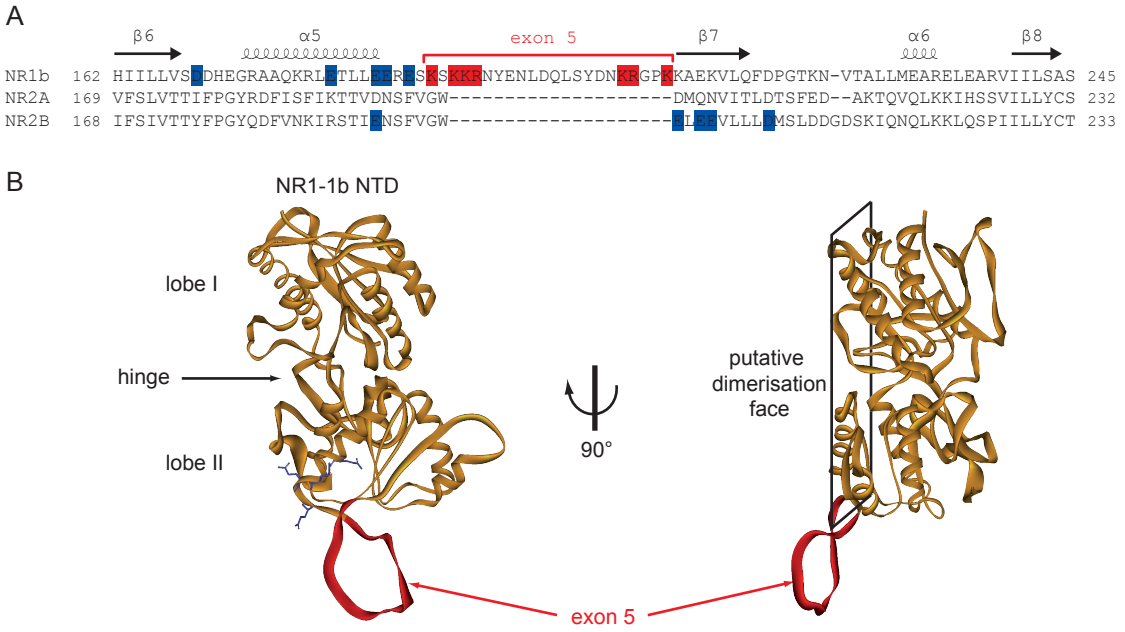


Figure 7.19 – Predicted structure of the NTD of NR1 splice variant NR1-1b. A, Sequence alignment of the β6-β8 regions of NR1-1b, NR2A and NR2B receptors. NR1-1b splice variant contains a supplementary loop of 22 residues at the bottom of the lobe II of its NTD, called exon 5. Exon 5 positively-charged residues are highlighted in red. The residues controlling spermine sensitivity are highlighted in blue. B, Homology model of NR1 NTD containing exon 5, generated using the crystallographic structure of NR2B NTD (pdb: 3jpw) as a template. The model is viewed from its putative dimerisation interface (left) and from the front of the domain (right). The exon 5 loop is colored in red. Acidic residues of NR1 NTD controlling spermine sensitivity are represented as blue sticks. Note that exon 5 and the putative polyamine potentiating site are located in the same region.

Exon 5 and polyamines acting at their glycine-independent and voltage-independent potentiating site share therefore several similarities: they both decrease pH sensitivity, they contain both positive charges and the insertion site of exon 5 and the binding site of polyamines are in the same region. Moreover, NR1-1b/NR2B receptors, which contain

exon 5, have been shown to be insensitive to polyamines (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995). These results suggested that exon 5 could act as a tethered ligand on polyamine glycine-independent potentiating site (Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995). During my PhD, I have obtained preliminary results that agree with this hypothesis and give insights into the mechanism of action of exon 5 on NR1/NR2B receptors.

We first investigated the mechanism by which insertion of exon 5 could decrease pH sensitivity of NR1/NR2B receptors. As polyamines also decrease the proton sensitivity of NR1/NR2B receptors, the same two hypothesis that were made for the mechanism of action of polyamines can be made for exon 5 (Figure 7.1): either exon 5 interacts with the ABD dimer interface between NR1 and NR2B subunits and stabilises it, preventing NMDARs from entering their "desensitised" state; or exon 5 acts at the level of the NTDs, preventing the lobes II of NR1 and NR2B NTDs from moving away. To discriminate between these two hypothesis, we studied the effet on pH sensitivity of the insertion of exon 5 on NMDARs containing an NR2B subunit deleted for its NTD (Figure 7.20). Proton dose-response curve of NR1-1b/NR2B receptors confirmed that insertion of exon 5 strongly decreased the pH sensitivity of NR1/NR2B receptors (pH $IC_{50} = 6.86 \pm 0.01$, $n = 4$, for NR1-1b/NR2Bwt receptors vs pH $IC_{50} = 7.41 \pm 0.01$, $n = 15$, for NR1-1a/NR2Bwt receptors; Figure 7.20). On the contrary, insertion of exon 5 had no effect on receptors deleted for NR2B NTD (pH $IC_{50} = 7.18 \pm 0.02$, $n = 4$, for NR1-1b/NR2B-ΔNTD receptors vs pH $IC_{50} = 7.17 \pm 0.03$, $n = 4$, for NR1-1a/NR2B-ΔNTD receptors; Figure 7.20). These results therefore indicate that exon 5 acts at the level of the NTDs, like polyamines. Traynelis et al. (1995) have proposed that exon 5 decreases pH sensitivity by shielding negative charges that probably form the "proton sensor". The lobe II dimer interface of NR1 and NR2B NTDs is enriched in negatively-charged residues and we have proposed that this interface could form a proton sensor (see Section 7.3.3). Thus, if we imagine that exon 5 interacts, like polyamines, with the lobes II of NR1 and NR2B NTDs,

the insert could indeed decrease pH sensitivity by shielding the negative charges that are present at this interface.

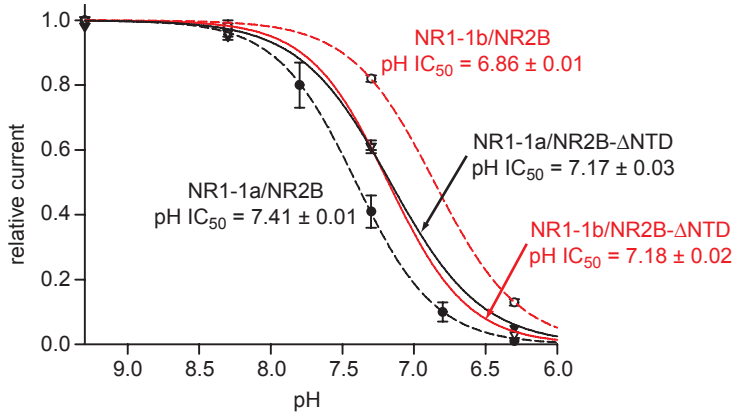


Figure 7.20 – NR2B NTD controls exon 5-induced decrease in pH sensitivity of NMDARs. Proton dose-response curves of wild-type NR1/NR2B or NR1/NR2B-ΔNTD receptors incorporating NR1 subunits that contain (NR1-1b) or not (NR1-1a) exon 5. Note that NR1-1a/NR2B-ΔNTD and NR1-1b/NR2B-ΔNTD receptors have the same pH IC_{50}.

We next tested the influence of exon 5 on glycine-independent and voltage-independent potentiation of NR1/NR2B receptors by polyamines. NR1-1b/NR2B receptors, which contain exon 5, have been shown to be insensitive to spermine (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995). The exon 5-induced disruption in spermine sensitivity of NR1/NR2B receptors may arise from two different effets: either spermine can still bind to its potentiating site but, as the pH sensitivity of the receptor is strongly decreased, no potentiation can be observed; or exon 5 and spermine compete for the same binding site. To eliminate the proton-dependent component of the effect of exon 5, we tested the effect of the application of 200 μM spermine on NR1/NR2B receptors containing or not exon 5 at pH IC_{50}, that is a pH at which both receptors are 50 % inhibited (Figure 7.21). At pH IC_{50} (pH = 6.9 for NR1-1b/NR2B receptors and 7.4 for NR1-1a/NR2B receptors), NR1-1b/NR2B receptors seemed effectively insensitive to spermine ($I_{spermine}/I_0 = 0.90 \pm 0.03$, $n = 4$, for NR1-1b/NR2B receptors vs $I_{spermine}/I_0 = 2.0 \pm 0.1$, $n = 6$, for NR1-1a/NR2B receptors; Figure 7.21A). Actually, for NR1-1b/NR2B recep-

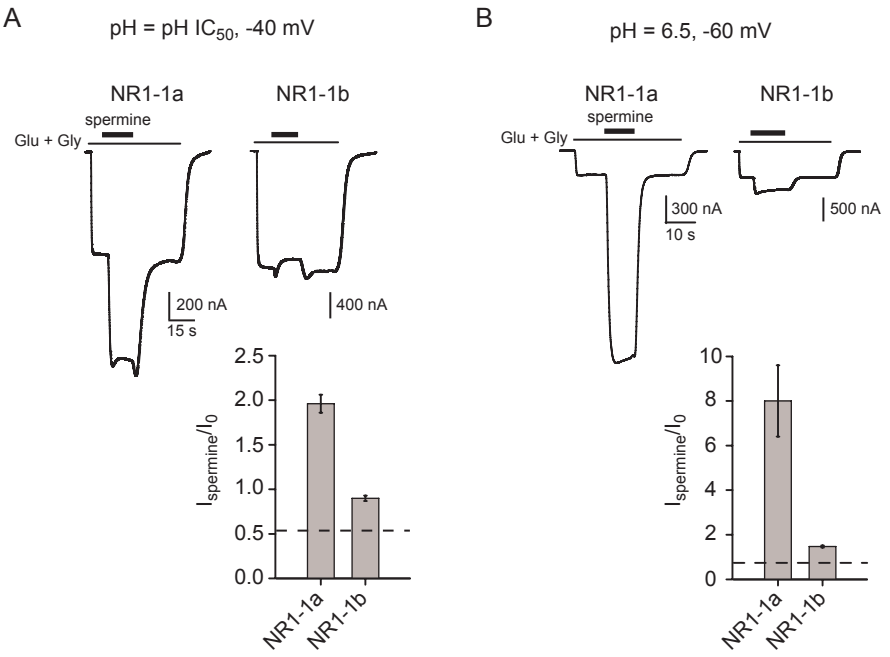


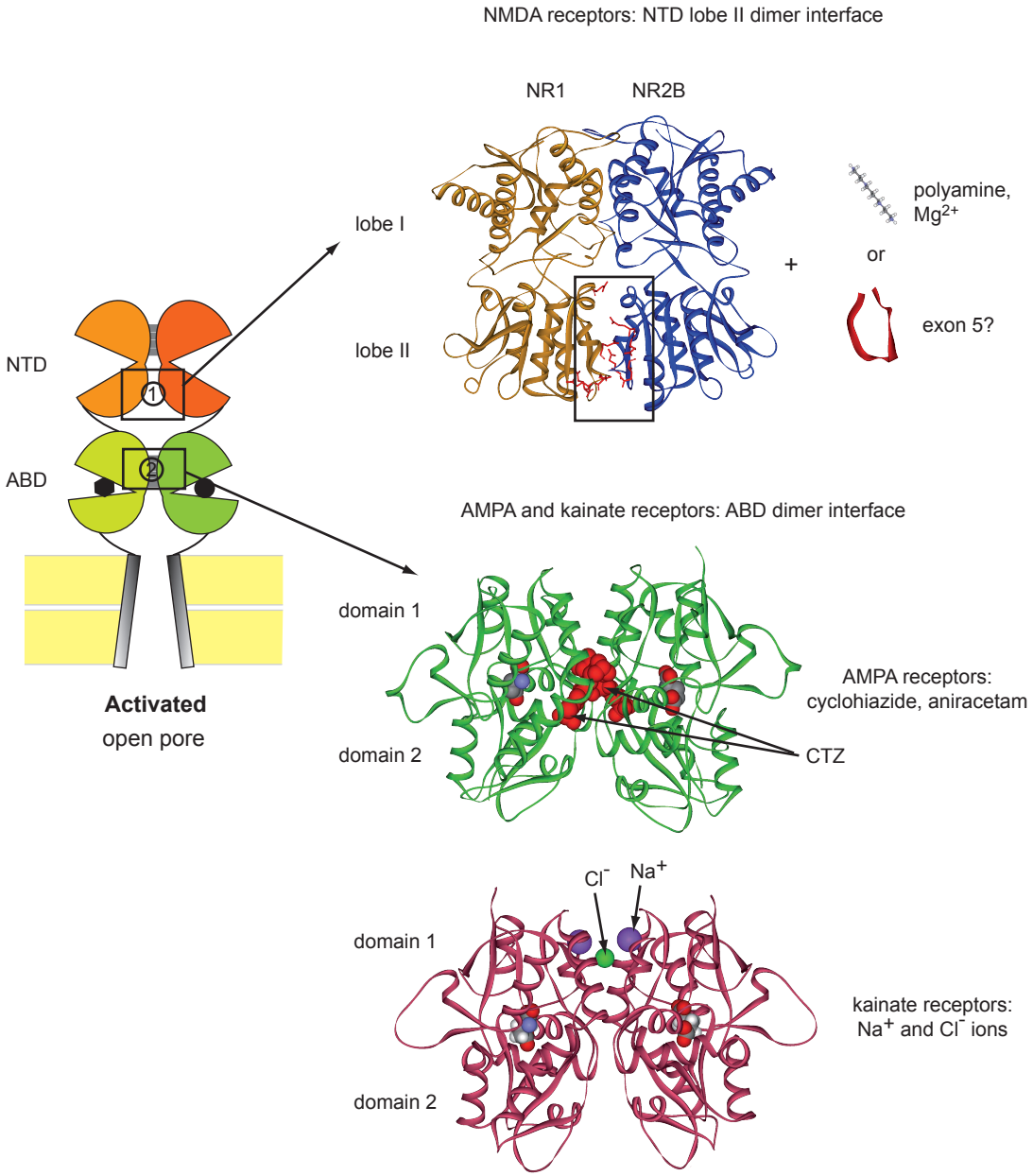
Figure 7.21 – Insertion of exon 5 strongly reduces but does not completely disrupts spermine sensitivity of NR2B-containing NMDA receptors. A, Top: typical current traces recorded from oocytes co-expressing NR1-1a or NR1-1b subunits with the NR2B subunit, at pH IC_{50} (pH of 7.4 for NR1-1a/NR2B receptors and 6.9 for NR1-1b/NR2B receptors) and at a holding potential of $-40\,mV$. Spermine was applied at a concentration of $200\,\mu M$. The bars upon the current traces indicate the duration of agonists and spermine applications. Note on the trace of NR1-1b/NR2B receptors that spermine-induced potentiation is completely masked by spermine-induced voltage-dependent inhibition. Bottom: amplitudes of spermine-induced modulations of NR1/NR2B receptors containing or not exon 5 at pH IC_{50} and $-40\,mV$. The dashed line represents spermine-induced inhibition of NR1/NR2A receptors at pH IC_{50} (pH = 7.0), which gives a idea of the amplitude of the voltage-dependent block induced by spermine at $-40\,mV$. The amplitudes of spermine-induced modulation at pH IC_{50} are 2.0 ± 0.1 ($n = 6$); 0.90 ± 0.03 ($n = 4$) and 0.54 ± 0.01 ($n = 2$) for NR1-1A/NR2B, NR1-1b/NR2B and NR1-1a/NR2A receptors, respectively. B, Top: typical current traces recorded from oocytes co-expressing NR1-1a or NR1-1b subunits with the NR2B subunit, at pH = 6.5 and at a holding potential of $-40\,mV$. Spermine was applied at a concentration of $200\,\mu M$. Bottom: amplitudes of spermine-induced modulations of NR1/NR2B receptors containing or not exon 5 at pH = 6.5 and $-60\,mV$. The dashed line represents spermine-induced inhibition of NR1/NR2A receptors at pH IC_{50} (pH = 7.0), which gives a idea of the amplitude of the voltage-dependent block induced by spermine at $-60\,mV$. The amplitudes of spermine-induced modulation at pH = 6.5 are 8.0 ± 1.6 ($n = 36$); 1.47 ± 0.05 ($n = 4$) and 0.90 ± 0.04 ($n = 17$) for NR1-1A/NR2B, NR1-1b/NR2B and NR1-1a/NR2A receptors, respectively.

tors, a small potentiation can be seen at pH = 6.9, but it is completely masked by the voltage-dependent block induced by spermine (Figure 7.21A). To verify that spermine can still potentiate NR1/NR2B receptors containing exon 5, we tested the spermine sensitivity of this receptor at pH = 6.5, a pH at which spermine induces a very large potentiation on NR1-1a/NR2B receptors ($I_{spermine}/I_0 = 8.0 \pm 1.6$, $n = 36$). Spermine sensitivity of NR1-1b/NR2B receptors was strongly decreased compared to NR1-1a/NR2B receptors ($I_{spermine}/I_0 = 1.47 \pm 0.05$, $n = 4$; Figure 7.21), but was not completely abolished, contrary to what was described in former studies (Durand et al., 1993; Zhang et al., 1994; Williams et al., 1994; Traynelis et al., 1995).

The fact that, at pH IC_{50}, spermine-induced potentiation was strongly reduced in the presence of exon 5 is in favour of a direct competition between polyamines and exon 5 rather than an indirect effect through the modification of the pH sensitivity. The hypothesis of a competition between polyamines and exon 5 is reinforced by the fact that both coumpounds act at the level of the NTDs and that the insertion site of exon 5 is very close to the binding site of spermine on the NR1 subunit. However, our results at pH = 6.5 indicated that, despite the presence of exon 5, spermine can still bind NR1-1b/NR2B receptors, but to a much lower extent than to NR1-1a/NR2B receptors.

7.3.6 The different strategies of positive allosteric modulation in iGluRs

The activity of the three main classes of iGluRs (AMPA, kainate and NMDA) can be positively modulated by molecules or ions. Two types of positive allosteric modulators can modulate the activity of AMPA receptors (see Section 1.3, page 1.3): modulators that decrease their deactivation rate, such as aniracetam (Jin et al., 2005) and modulators that decrease their desensitisation rate, such as cyclothiazide (Sun et al., 2002). No such ligands have been found for kainate receptors, but it has been shown that their activity can be modulated by Na^+ and Cl^- ions (Chaudhry et al., 2009a). Finally, NMDARs can be potentiated by polyamines and it has been proposed that exon 5 insert could act as a


NMDA receptors: NTD lobe II dimer interface
NR1
NR2B
lobe I
lobe II
polyamine, Mg2+
or
exon 5?
NTD
ABD
1
2
Activated
open pore
AMPA and kainate receptors: ABD dimer interface
domain 1
domain 2
AMPA receptors: cyclohiazide, aniracetam
CTZ
Cl-
Na+
domain 1
domain 2
kainate receptors: Na+ and Cl- ions

tethered modulator acting at polyamine potentiating site. It has moreover been proposed that magnesium could be the endogenous ligand acting at NR2B-specific polyamine potentiating site (Paoletti et al., 1995 et voir Section 3.3, page 116). However, the strategies for positive allosteric modulation diverge between NMDA and non-NMDA receptors. Indeed, in AMPA and kainate receptors, positive allosteric modulators, either organic molecules for AMPA receptors or ions for kainate receptors, bind at the dimer interface between ABDs (Sun et al., 2002; Jin et al., 2005; Chaudhry et al., 2009a and see Figure 7.22). They stabilise the ABD dimer interface and prevent its disruption, thus increasing the activity of the receptors. On the contrary, on NMDARs, no organic molecule or ion that binds to the ABD dimer interface has been found so far, although this interface is likely to undergo the same conformational changes as the one of AMPA and kainate receptors (Gielen et al., 2008). On these receptors, at least for NMDARs containing the NR2B subunit, positive allosteric modulation rather occurs through the stabilisation of the NTD lobe II dimer interface (Figure 7.22), which indirectly also stabilises the ABD dimer interface. This different mechanism for NMDARs is reminiscent of the particular role of their NTDs compared to the NTDs other iGluRs. Indeed, whereas the NTDs of NMDARs have been shown to modulate NMDAR activity, either through the binding of modulators, or through spontaneous oscillations, AMPA and kainate NTDs do not seem to have such an

Figure 7.22 – Different strategies of positive allosteric modulation among iGluRs. Positive allosteric modulation on iGluRs occurs through stabilisation of inter-subunit interfaces, either at the NTD lobe II dimer interface for NMDARs containing the NR2B subunit, or at the ABD dimer interface for AMPA and kainate receptors. Up, Ribbon representation of a homology model of an NR1/NR2B NTD dimer based on the crystallographic structures of GluR2 and GluR6 NTD dimers (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). The acidic residues putatively involved in polyamine binding are represented as red sticks. The NTD lobe II dimer interface is highlighted by an open rectangle. The ligands of this NTD dimer interface are polyamines, magnesium and putatively exon 5. Middle, Ribbon view of the cystallographic structure of an ABD dimer of AMPA receptors (GluR2 subunit) bound with glutamate (CPK representation with grey carbon atoms) and cyclothiazide (CTZ; in red, CPK representation). pdb: 1lbc (Sun et al., 2002). Bottom, Ribbon view of the cystallographic structure of an ABD dimer of kainate receptors (GluR6 subunit) bound with glutamate (CPK representation with grey carbon atoms) and Na^+ (purple sphere) and Cl^- (green sphere) ions. pbd: 3g3j (Chaudhry et al., 2009a).

important role in receptor activity. Crystallographic structures of NTD dimers of AMPA and kainate receptors have revealed that the conformation of the NTD dimers are packed together by strong inter-protomer interactions at the level both lobe I and lobe II dimer interfaces (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009). As a consequence, the lobe II NTD dimer interface of AMPA and kainate receptors is unlikely to undergo the conformational changes that occur in NMDA receptors.

Despite these differences in the binding site of the modulators, it appears that iGluRs have developed a common mechanism for positive allosteric modulation: the stabilisation of inter-subunit interfaces

Conclusion générale

Près de vingt ans de pharmacologie ont mis en évidence l'existence d'une multitude de molécules organiques ou d'ions contrôlant l'activité des récepteurs NMDA. Ces récepteurs sont en effet, parmi les iGluRs, ceux présentant la pharmacologie la plus riche et sont probablement modulés *in vivo* par de nombreux ligands tels que les protons, le zinc et le magnésium. Les sites de liaison de ces modulateurs allostériques, distants du coeur central d'activation des récepteurs NMDA (domaines de liaison des agonistes et canal ionique) sont encore mal connus. Les antagonistes ciblant les domaines N-terminaux des récepteurs NMDA (zinc et dérivés de l'ifenprodil) sont parmi les mieux caractérisés actuellement, grâce à la similarité de structure de ces domaines N-terminaux avec les protéines et domaines de la famille LIVBP, famille de protéines partageant des principes communs de repliement, de liaison de ligands et de changement conformationnels. Nous avons exploité cette similarité de structure afin de proposer, par modélisation moléculaire, un mode de liaison pour l'ifenprodil au sein du NTD de la sous-unité GluN2B. Nous avons aussi proposé que l'interface de dimérisation entre les NTDs des sous-unités GluN1 et GluN2 forme le site de liaison des polyamines, l'une des rares classes de modulateurs allostériques positifs des récepteurs NMDA. À l'issue de ce travail, il apparaît donc que les NTDs des récepteurs NMDA possèdent de multiples sites de liaison intra et inter-protomère, en particulier les récepteurs NMDA comportant la sous-unité GluN2B.

De grandes avancées ont été faites dans la compréhension des mécanismes par lesquels les changements conformationnels des NTDs, spontanés ou induits par la fixation d'un

ligand, sont transduits en ouverture/fermeture du canal ionique des récepteurs NMDA (Gielen et al., 2008, 2009). Ces études se sont focalisées sur l'étude d'un seul protomère, le NTD de la sous-unité GluN2. Dans cette thèse, nous avons proposé un mécanisme à l'échelle d'un dimère de NTDs GluN1/GluN2B, par lequel des changements conformationnels intra- et interprotomère sont responsables de la modulation de l'activité des récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B.

Parce qu'ils oscillent spontanément entre différents états conformationnels et parce qu'ils possèdent des sites de liaison pour des modulateurs allostériques négatifs et positifs, les NTDs jouent un rôle prépondérant dans le contrôle de l'activité des récepteurs NMDA. Parmi les différents grands modules de ces récepteurs (pore, ABD, NTD), ce sont eux qui constituent la partie la plus divergente (seulement 1 % d'identité entre toutes les sous-unités de récepteurs NMDA, contre ~ 20 % d'identité entre les ABDs et ~ 15 % d'identité dans la région du pore). Cette diversité de séquence est en adéquation avec la diversité pharmacologique et biophysique (différences de Po) entre différents sous-types induite par ces modules.

Cependant, même si, grâce à de nombreuses étude d'électrophysiologie, de mutagénèse dirigée, de biochimie et de modélisation moléculaire, la vision du rôle des sites de liaison et des changements conformationnels des NTDs s'est précisée, cette vision reste floue, par manque de données structurales. Ceci est en train de changer. La structure cristallographique du NTD de GluN2B (Karakas et al., 2009) a permis de clarifier le mode de liaison du zinc dans ce domaine. Cette structure a d'ailleurs montré que les structures des protéines de la famille LIVBP, et même les structures des NTDs des autres iGluRs, ne constituaient pas des modèles si fiables pour prédire la structure des NTDs des récepteurs NMDA. Alors qu'en est-t'il de l'organisation dimérique, voire tétramérique de ces domaines ? Nous attendons des structures cristallographiques de dimères ou de tétramères de NTDs, qui, comme cela a été le cas pour les récepteurs métabotropiques du glutamate, pourraient nous renseigner de façon plus précise sur les changements conformationnels ayant lieu au

sein de la région N-terminale des récepteurs NMDA.

Qu'en est-t-il des NTDs des récepteurs AMPA et kainate ? Les NTDs ont-ils un rôle modulateurs chez ces récepteurs ? Les structures cristallographiques récemment publiées de dimères de NTDs des récepteurs AMPA et kainate (Kumar et al., 2009; Jin et al., 2009; Clayton et al., 2009) montrent que les NTDs au sein d'un dimère sont "collés" l'un à l'autre par de fortes interactions hydrophobes au niveau de leurs lobes I et II, ce qui leur confère une importante rigidité. Il est donc peu probable que ces NTDs subissent des changements conformationnels de la même manière que ceux des récepteurs NMDA. Cependant, si cette affirmation est probablement vraie pour les sous-unités kainate GluK2 (Kumar et al., 2009), elle doit être nuancée pour les NTDs des récepteurs AMPA GluA2. En effet, une certaine mobilité des lobes II des NTDs a été observée chez ces récepteurs (Clayton et al., 2009). De plus, l'espace interlobaire des NTDs des récepteurs AMPA est fortement conservé, suggérant que cette region puisse former un site de liaison pour des modulateurs allostériques, comme c'est le cas pour les récepteurs NMDA.

Enfin, on peut se demander ce que l'on entend par "modulateur allostérique". Dans cette étude, nous avons défini comme tels des molécules organiques ou des ions se liant dans des structures distantes du coeur d'activation des iGluRs (domaines de liaison des agonistes et canal ionique) et qui modifient l'activité de ces récepteurs. Dans une vision plus large, on pourrait inclure dans cette définition les protéines pouvant s'associer aux iGluRs qui ont été mises en évidence ces dernières années. C'est le cas des TARP (pour "transmembrane AMPA receptor regulating protein"), par exemple, qui s'associent aux récepteurs AMPA pour en moduler l'expression et le trafic à la membrane plasmique, mais aussi les propriétés de "gating" (désactivation, désensibilisation), ainsi que les propriétés pharmacologiques (Chen et al., 2000; Tomita et al., 2005; Bats et al., 2007; Menuz et al., 2007). Récemment, une telles protéine a aussi été trouvée pour les récepteurs NMDA : Neto1 (Ng et al., 2009). Ainsi, la compréhension de la modulation de l'activité des iGluRs dans des conditions plus physiologiques passera certainement par l'étude au niveau moléculaire des interactions

entre les iGluRs et ces protéines accessoires.

Une autre question qui reste à résoudre concerne la spécificité des modulateurs allostériques des récepteurs NMDA. Jusqu'à présent les seules molécules organiques sélectives d'un sous-type ciblent les récepteurs NMDA contenant la sous-unité GluN2B. Peux-t-on concevoir des molécules organiques capables de moduler sélectivement l'activité des récepteurs contenant les sous-unités GluN2A, GluN2C , GluN2D, ou les sous-unités GluN3 ? La découverte de tels modulateurs constituerait une avancée pharmacologique remarquable pour l'étude des récepteurs NMDA natifs. Ces types de composés pourraient aussi avoir un fort potentiel thérapeutique et constituer une alternative aux antagonistes des récepteurs NMDA déjà développés.

Troisième partie

Annexes

7.4 Abbréviations

$3\alpha5\beta$S	sulfate de 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one
ABD	Domaine de liaison des agonistes
ACh	Acétylcholine
AMPA	Acide (S)-α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionique
ANPR	Récepteur aux peptides atriaux natriurétiques
AUC	Aire sous la courbe
CAP	"Chemicals available for purchase"
CPK	Corey-Pauling-Koltun
CTD	Domaine C-terminal
CTZ	Cyclothiazide
D-AP5	Acide D-2-amino-5-phosphonopentanoïque
EAAT	Transporteur des acides aminés excitateurs
EPSC	Courant post-synaptique excitateur
GABA	Acide γ-aminobutyrique
HEK	"human embryonic kidney"
iGluR	Récepteur ionotropique du glutamate
LAOBP	"Lysine/arginine/ornithine-binding protein"
LIVBP	"Leucine/isoleucine/valine-binding protein"
LTD	Dépression à long terme
LTP	Potentiation à long terme
mGluR	Récepteur métabotropique du glutamate
MTS	Méthane-thiosulfonate
MTSEA	Méthane-thiosulfonate de 2-aminoéthyle
MTSET	Méthane-thiosulfonate de 2-(triméthylammonium)éthyle
MTSPtrEA	Méthane-thiosulfonate de 3-(triéthylammonium)propyle
NMDA	Acide N-méthyl-D-aspartique
NTD	Domaine N-terminal
PBP	Protéine bactérienne périplasmique
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
Po	Probabilité d'ouverture
PS	Sulfate de pregnenolone
QBP	"Glutamine-binding protein"
RCPG	Récepteurs couplés aux protéines G
ROC	"Receiver operating characteristics"
SNC	Système nerveux central
VFD	Domaine "Venus flytrap"
VGluT	Transporteur vésiculaire du glutamate

7.5 Couleurs conventionnelles de représentation des atomes d'une molécule organique ou d'une protéine

Carbone	Gris
Oxygène	Rouge
Azote	Bleu foncé
Hydrogène	Blanc
Soufre	Jaune
Fluor	Bleu turquoise
Chlore	Vert clair
Phosphore	Orange

7.6 Légende de l'alignement supplémentaire

Alignement : alignement structural de protéines représentatives de la famille LIVBP. L'alignement a été généré à partir de la superposition de l'ensemble des structures tridimensionnelles des protéines, puis raffiné à la main. Les protéines réprésentées sont les suivantes : LIVBP, "leucine/isoleucine/valine-binding protein" (pdb : 2LIV) ; LBP, "leucine-binding protein" (pdb : 1USK) ; $mGlu_1$, récepteur métabotropique du glutamate 1 (pdb : 1EWK) ; $mGlu_3$, récepteur métabotropique du glutamate 3 (pdb : 2E4U) ; $mGlu_7$, récepteur métabotropique du glutamate 7 (pdb : 2E4Z) ; GluA2, sous-unité GluA2 des récepteurs AMPA (pdb : 3H6G) ; GluK2, sous-unité GluK2 des récepteurs kainate (pdb : 3H5V) ; GluN2B, sous-unité GluN2B des récepteurs NMDA (pdb : 3JPW) ; NPR-C, "natriuretic-peptide receptor C" (pdb : 1JDP) ; AlBP, D-allose-binding protein (pdb : 1RPJ) ; RiBP, "ribose-binding protein" (pdb : 2DRI) ; GGBP, "glucose/galactose-binding protein" (pdb : 1GCA) ; ArBP, "L-arabinose-binding protein" (pdb : 5ABP) ; STP, "sugar transport protein" (pdb : 1TJY). LIVBP, LBP, $mGlu_1$, $mGlu_3$ et $mGlu_7$ lient des acides aminés. AlBP, RiBP, GGBP, ArBP et STP lient des sucres.

Les résidus impliqués dans des hélices α ou des feuillets β sont colorés en rouge et vert, respectivement. Les barres situées sous l'alignement de séquences représentent l'emplacement des lobes I et II, ainsi que de la charnière : le lobe I est représenté par une barre bleue, le lobe 2 par une barre fushia et la charnière par une barre jaune. Les résidus impliqués dans la liaison des ligands sont indiqués par un rectangle coloré. La signification de la couleur des réctangles varie en fonction des protéines considérées.

- Dans les protéines liant les amino acides (LIVBP, LBP, $mGlu_1$, $mGlu_3$ et $mGlu_7$), les rectangles jaunes indiquent les résidus conservés qui lient interagissent avec la fonction amino-acide à proprement parler. Les autres résidus interagissant avec les acides aminés sont marqués par un rectangle jaune. Les résidus de la signature (voir Section 2.1.2) sont représentés en gras.
- La sous-unité GluN2B lie le zinc et l'ifenprodil. Les résidus marqués par un rectangle fushia plein lient le zinc dans la structure cristallographique de GluN2B, ceux marqués par un rectangle fushia ouvert ne contactent pas directement le zinc mais contrôlent spécifiquement la sensibilité au zinc des récepteurs GluN1/GluN2B. Les résidus marqués par un rectangle vert contrôlent sélectivement la sensibilité des récepteurs GluN1/GluN2B à l'ifenprodil. Les résidus indiqués par un rectangle bleu contrôlent à la fois les sensibilités au zinc et à l'ifenprodil des récepteurs GluN1/GluN2B.
- Pour les protéines liant des sucres (AlBP, RiBP, GGBP, ArBP et STP) et NPR-C, les résidus impliqués dans la liaison des ligands sont indiqués par un rectangle bleu.

7.7 Article V

Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits

Marc Gielen, Beth Siegler Rechtless, Laetitia Mony, John W. Johnson, and Pierre Paoletti

Nature 459 (2009) 703–707

LETTERS

Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits

Marc Gielen[1], Beth Siegler Retchless[2], Laetitia Mony[1], Jon W. Johnson[2] & Pierre Paoletti[1]

***N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors (NMDARs) are a major class of excitatory neurotransmitter receptors in the central nervous system. They form glutamate-gated ion channels that are highly permeable to calcium and mediate activity-dependent synaptic plasticity[1]. NMDAR dysfunction is implicated in multiple brain disorders, including stroke, chronic pain and schizophrenia[2]. NMDARs exist as multiple subtypes with distinct pharmacological and biophysical properties that are largely determined by the type of NR2 subunit (NR2A to NR2D) incorporated in the heteromeric NR1/NR2 complex[1,3,4]. A fundamental difference between NMDAR subtypes is their channel maximal open probability (P_o), which spans a 50-fold range from about 0.5 for NR2A-containing receptors to about 0.01 for receptors containing NR2C and NR2D; NR2B-containing receptors have an intermediate value (about 0.1)[5–9]. These differences in P_o confer unique charge transfer capacities and signalling properties on each receptor subtype[4,6,10,11]. The molecular basis for this profound difference in activity between NMDAR subtypes is unknown. Here we show that the subunit-specific gating of NMDARs is controlled by the region formed by the NR2 amino-terminal domain (NTD), an extracellular clamshell-like domain previously shown to bind allosteric inhibitors[12–15], and the short linker connecting the NTD to the agonist-binding domain (ABD). The subtype specificity of NMDAR P_o largely reflects differences in the spontaneous (ligand-independent) equilibrium between open-cleft and closed-cleft conformations of the NR2-NTD. This NTD-driven gating control also affects pharmacological properties by setting the sensitivity to the endogenous inhibitors zinc and protons. Our results provide a proof of concept for a drug-based bidirectional control of NMDAR activity by using molecules acting either as NR2-NTD 'closers' or 'openers' promoting receptor inhibition or potentiation, respectively.**

We first explored the role of the NR2-NTD in the difference of P_o between NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors by evaluating the effect of deleting the entire NR2-NTD on receptor activity. We estimated P_o by using a method based on the covalent modification of a cysteine residue introduced in the NR1 subunit (NR1-A652C), which locks open the NMDAR channel[16]. Although this method does not give access to the absolute P_o of receptors containing the wild-type NR1 (NR1wt) subunit, it can report relative differences in channel activity[17]. Indeed, the extent to which the thiol-modifying reagent 2-aminoethylmethanethiosulphonatehydrobromide (MTSEA) potentiates NMDAR currents is inversely related to the channel P_o (ref. 17). MTSEA potentiated currents carried by NR1-A652C/NR2B receptors to a much greater extent than currents of NR1-A652C/NR2A receptors (Fig. 1a, d), consistent with the much lower P_o of NR2B-containing receptors than that of NR2A-containing receptors[5,6,17]. In contrast, MTSEA-induced potentiations of NR1-A652C/NR2A-ΔNTD and NR1-A652C/NR2B-ΔNTD receptors were indistinguishable (Fig. 1b, d), indicating equal receptor activities. However, receptors incorporating chimaeric NR2A-(2B NTD) or NR2B-(2A NTD) subunits displayed MTSEA-induced potentiations similar to those of the parental NR2 subunits, indicating that swapping the NTDs alone did not exchange the P_o (Fig. 1d). We therefore swapped both the NTD and the highly divergent short (14 residues) linker segment that connects the NTD to the ABD (Supplementary Fig. 1). NR1-A652C/NR2A-(2B NTD+L) and NR1-A652C/NR2B-(2A NTD+L) responses supported levels of MTSEA potentiation closer to those of NR2Bwt-containing and NR2Awt-containing receptors, respectively (Fig. 1c, d). Direct measurement of channel activity with single-channel recordings confirmed this exchange of P_o (Fig. 1e and Supplementary Fig. 2).

We next extended the analysis to the NR2D subunit. MTSEA-induced potentiations of NR2D-containing receptors were considerable (about 300-fold), reflecting the very low P_o of NR1/NR2D receptors (Fig. 1d). Deleting the NR2D-NTD resulted in a fourfold decrease in MTSEA potentiation, indicative of a markedly increased P_o (Fig. 1d). This gain-of-function phenotype could be reinforced by grafting onto NR2D-ΔNTD the NTD plus linker (NTD+L) region of the high-P_o subunit NR2A. Conversely, receptors containing the chimaeric NR2A-(2D NTD+L) subunit displayed 17-fold higher potentiation by MTSEA than NR2Awt-containing receptors, suggestive of a much lower P_o (Fig. 1d). Thus, the low P_o of the NR2D-containing receptors is also set by the NR2-NTD.

Because the estimation of P_o with MTSEA relies on a mutated NR1 subunit (NR1-A652C), we checked that the effects observed did not depend on this mutation. We used the time constant of inhibition by MK-801, an NMDAR open-channel blocker, as an alternative method of assessing P_o (refs 5, 18). Consistent with the higher P_o of receptors containing NR2A than that of receptors containing NR2B, MK-801 inhibited wild-type NR1/NR2A receptors significantly faster than wild-type NR1/NR2B receptors (Supplementary Fig. 3a, b). Deleting the NR2-NTDs abolished this difference (Supplementary Fig. 3b). Whereas swapping the NR2-NTD alone did not exchange MK-801 time constants, incorporating the NTD-ABD linker achieved almost complete transfer (Supplementary Fig. 3a, b). As expected, the onset of MK-801 inhibition at wild-type NR1/NR2D receptors was much slower than that at receptors containing NR2A or NR2B. Deleting the NR2D-NTD or replacing the NTD+L region of NR2D by that of NR2A strongly accelerated MK-801 inhibition, indicative of a much increased P_o (Fig. 1f and Supplementary Fig. 3c). Conversely, MK-801 inhibition of receptors incorporating NR2A-(2D NTD+L) was 15-fold slower than at NR2Awt-containing receptors (Supplementary Fig. 3b). Together with the MTSEA experiments, these results demonstrate that the NR2-NTD+L region is a major determinant of the NR2 subunit-specific activity of NMDARs.

[1]Laboratoire de Neurobiologie, École Normale Supérieure, CNRS, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. [2]Department of Neuroscience, University of Pittsburgh, A210 Langely Hall, Pittsburgh, Pennsylvania 15260, USA.

©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

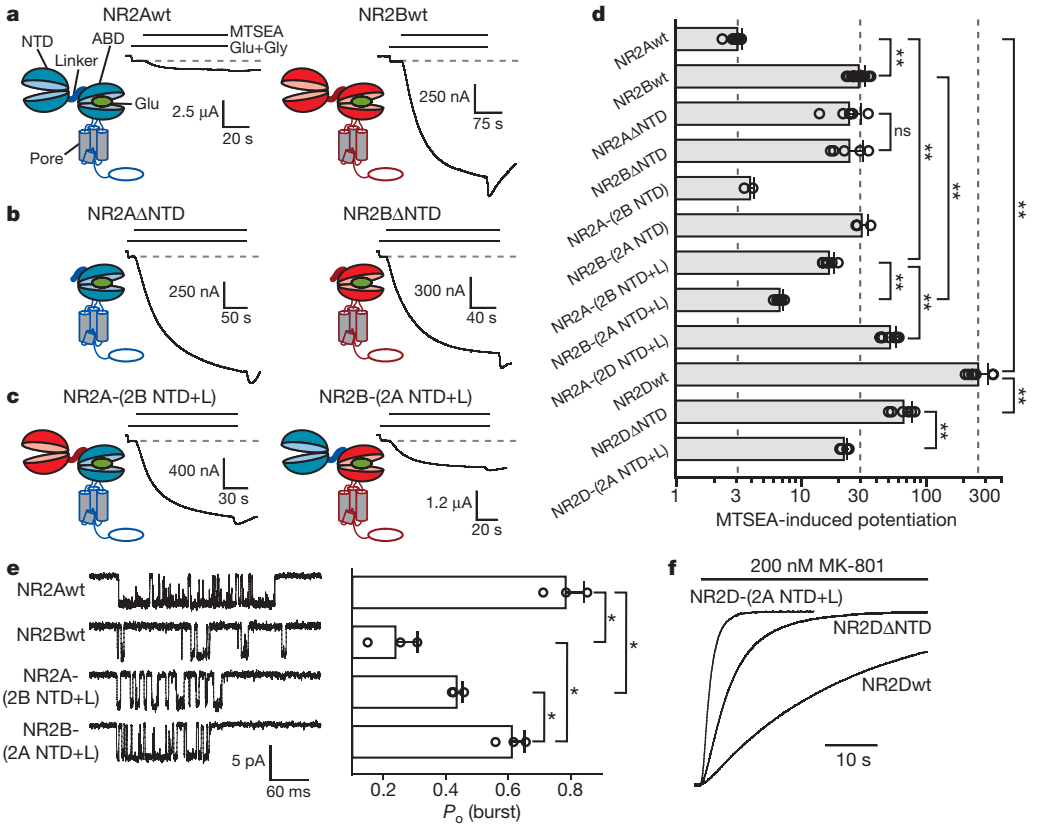


Figure 1 | The NR2 NTD+L region controls NMDAR P_o. **a–c**, Potentiation by MTSEA of receptors incorporating NR1-A652C and NR2Awt or NR2Bwt (**a**), NR2A-ΔNTD or NR2B-ΔNTD (**b**), and NR2A-(2B NTD+L) or NR2B-(2A NTD+L) (**c**). **d**, Pooled data (means ± s.d.), from top to bottom: 3.2 ± 0.3 ($n = 12$), 30 ± 4 ($n = 14$), 25 ± 6 ($n = 6$), 25 ± 7 ($n = 5$), 4.0 ± 0.3 ($n = 3$), 32 ± 4 ($n = 3$), 17 ± 2 ($n = 6$), 6.9 ± 0.5 ($n = 5$), 53 ± 7 ($n = 9$), 270 ± 60 ($n = 7$), 68 ± 12 ($n = 6$) and 23 ± 2 ($n = 5$). Two asterisks, $P < 0.001$. **e**, P_o within bursts of openings for receptors incorporating NR1wt and the indicated NR2 subunit. Left: representative traces of bursts. Right (from top to bottom): 0.78 ± 0.06 ($n = 3$), 0.24 ± 0.07 ($n = 3$), 0.43 ± 0.02 ($n = 3$) and 0.61 ± 0.04 ($n = 3$). Asterisk, $P < 0.05$, Student's *t*-test. Error bars represent s.d. **f**, Kinetics of inhibition by 200 nM MK-801 at receptors incorporating NR1wt and NR2Dwt ($\tau_{on} = 32$ s), NR2D-ΔNTD (5.7 s) or NR2D-(2A NTD+L) (1.6 s).

We then investigated the mechanism by which a distal domain, the NR2-NTD, influences channel activity. Previous studies on allosteric inhibition of NMDARs by NR2-NTD ligands, such as zinc and ifenprodil, suggested that these ligands bind the NTD cleft and promote its closure[12,15,19]. This in turn leads to receptor inhibition through disruption of the NR1/NR2 ABD dimer interface, resembling

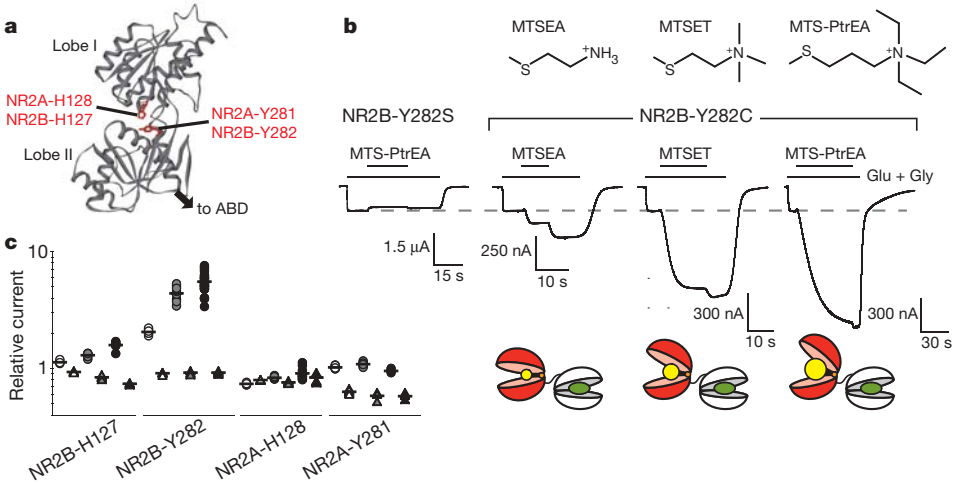


Figure 2 | Locking open the NR2-NTD increases NMDAR activity. **a**, Three-dimensional model of NR2B-NTD. **b**, Top: chemical formula of the transferable moiety of MTSEA, MTSET and MTS-PtrEA. Middle: recordings from NR1wt/NR2B-Y282C and control NR1wt/NR2B-Y282S receptors during treatment with MTS. The potentiation after washout of MTS probably reflects the washout of a reversible pore-blocking effect of the positively charged MTS. Bottom: schematic representations of the NTD-ABD tandem of NR2B-Y282C after modification by MTS (MTS headgroup in yellow). **c**, Relative currents after application of MTSEA (white symbols), MTSET (grey symbols) and MTS-PtrEA (black symbols) to receptors incorporating NR1wt and the indicated NR2 subunit harbouring a cysteine mutation (circles) or a control mutation (triangles). See Supplementary Table 1 for values.

©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

the mechanism underlying the desensitization of AMPA (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) receptors[20–22]. Because the NTD can adopt at least two conformations, a ligand-free open state and a ligand-bound closed state, we speculated that the NTD-driven control of P_o might result from spontaneous oscillations of the NR2-NTD between an open-cleft conformation, favouring channel opening, and a closed-cleft conformation, favouring pore closure. Similar ligand-independent oscillations have been observed in several clamshell-like proteins, including the bacterial maltose-binding protein[23] (MBP) and the $GABA_B$ (γ-aminobutyric acid B) receptor[24]. To test this hypothesis, we introduced cysteine residues into the NR2-NTD cleft to lock open the NR2-NTDs with the use of thiol-reactive methanethiosulphonate (MTS) reagents. On the basis of three-dimensional models, we first introduced a cysteine residue deep in the cleft of the NR2B-NTD by mutating the hinge residue NR2B-Y282, whose side chain points towards the cleft entrance[25] (Fig. 2a). Application of the positively charged MTSEA potentiated NR1wt/NR2B-Y282C receptors but not control NR1wt/NR2B-Y282S receptors (Fig. 2b). Using MTS compounds of the same valence but different sizes (2-[trimethylammonium]ethylmethanethiosulphonatebromide [MTSET] and 3-[triethylammonium]propylmethanethiosulphonatebromide [MTS-PtrEA]), we observed that the potentiation increased with increasing MTS size (Fig. 2b, c). Comparison of the rates of inhibition by MK-801 before and after treatment with MTS, together with direct measurement of single-channel activity, revealed that current potentiations reflected an increase in P_o (Supplementary Figs 4 and 5). Sensitivity to glycine (binding the NR1-ABD) was unaltered by treatment with MTS, whereas sensitivity to glutamate (binding the NR2-ABD) was slightly decreased (Supplementary Fig. 6), as expected from the known allosteric interaction between the NR2 NTD and ABD[26]. MTS action was significantly faster on resting receptors than on activated receptors (Supplementary Fig. 7), further arguing for a facilitated opening of the NR2-NTD when the ABD is open. Taken together, these results show that trapping open the NR2-NTD enhances receptor activity. They also indicate that the NTD of NR2B-Y282C is neither permanently open (because there was a potentiating effect of the MTS compounds) nor closed (because the introduced cysteine residue was accessible to MTS), but rather alternates between open and closed conformations, the latter favouring pore closure.

Because NR2B-Y282 is a large residue, we considered the possibility that its mutation into a small residue (cysteine or serine) might have artificially increased the flexibility of the NTD hinge, favouring NTD closure. Indeed, such mutations strongly decreased receptor activity (Supplementary Fig. 8). This effect highlights the unsuspected role of the NR2-NTD hinge in shaping NMDAR P_o, reminiscent of the critical role of the MBP hinge in controlling the apparent maltose affinity[27]. To extend our conclusion of spontaneous NR2-NTD oscillations to receptors with unaltered gating properties, we targeted H127 of NR2B-NTD, because its mutation into cysteine minimally affects receptor activity (Supplementary Fig. 8). MTS compounds still potentiated NR1wt/NR2B-H127C receptors (but not control NR1wt/NR2B-H127A receptors) in a size-dependent manner. However, potentiations were considerably smaller than with NR1wt/NR2B-Y282C receptors (Fig. 2c and Supplementary Fig. 9a). Two reasons may explain this difference: higher basal P_o of NR1wt/NR2B-H127C receptors, and wider opening of the NTD at MTS-modified NR2B-Y282C subunits because of the deeper location of Y282 in the cleft. Taken together, these results provide the new information that spontaneous oscillations of the NR2B-NTD contribute to the low P_o of wild-type NR1/NR2B receptors.

We then tested the prediction that the high P_o of NR2A-containing receptors results from the preference of NR2A-NTD for the open conformation. As with NR2B, we found the P_o of NR2A-containing receptors to be significantly decreased by the mutation of NR2A-Y281 into small residues (Supplementary Fig. 8). A potentiating component was also observed at receptors containing NR2A-Y281C during treatment with MTS compounds, but not at control NR2A-Y281A receptors. However, MTS-induced potentiations were much smaller than at NR2B-Y282C receptors and were independent of MTS size (Fig. 2c and Supplementary Fig. 9b), suggesting that the NR2A-NTD is much less sensitive to steric hindrance than the NR2B-NTD. In addition, no potentiation was observed at NR2A-H128C receptors even with the larger MTSET and MTS-PtrEA (Fig. 2c and Supplementary Fig. 9b). This is consistent with the idea that NR2A-NTD spends most of its time in an open-cleft conformation, thus contributing to the relatively high P_o of NR2A-containing receptors.

Our results on chimaeric NR2 subunits, showing that the NTD-ABD linker is required for the differential influence of the NR2-NTD on receptor P_o, raised the possibility that this element is also crucial during the allosteric modulation of NMDARs by NTD ligands. NR2A-NTD forms a high-affinity zinc inhibitory site[12–14]; in accord with this, NR1wt/NR2D-(2A NTD+L) receptors were highly sensitive to zinc (Fig. 3a). NR1wt/NR2B-(2A NTD) receptors are also highly sensitive to zinc. Surprisingly, zinc is much more potent at these receptors than at wild-type NR1/NR2A receptors (Fig. 3a), suggesting that the NR2B NTD-ABD linker facilitates NTD-cleft closure. Increasing the chimaera length to incorporate the NR2A NTD-ABD linker almost completely restored NR2Awt-like zinc sensitivity (Fig. 3a). This again highlights the importance of the

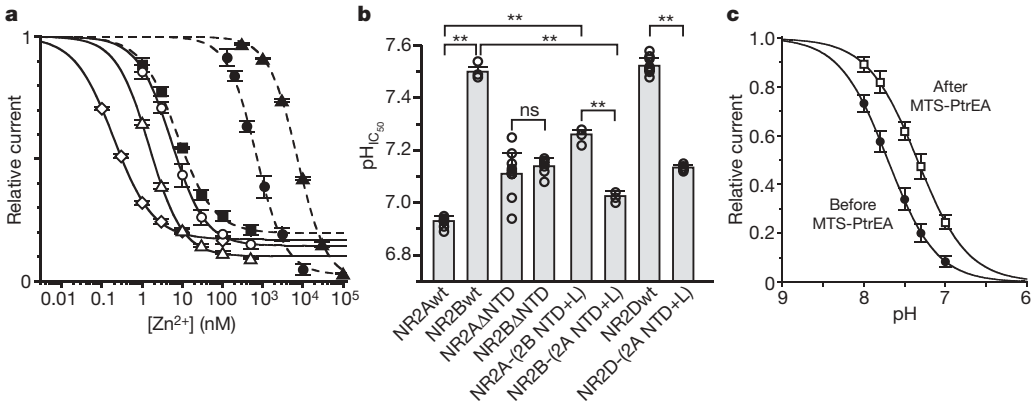


Figure 3 | The NR2 NTD+L region controls zinc and proton sensitivities of NMDARs. **a**, Zinc sensitivity of receptors incorporating NR1wt and NR2Awt (filled squares; maximum inhibition 81%, IC_{50} 7.5 nM; $n = 6$), NR2Bwt (filled circles; 98%, 720 nM; $n = 13$), NR2Dwt (filled triangles; 100%, 7.8 μM; $n = 3$), NR2B-(2A NTD) (open diamonds; 83%, 0.20 nM; $n = 4$), NR2B-(2A NTD+L) (open circles; 86%, 5.4 nM; $n = 4$) or NR2D-(2A NTD+L) (open triangles; 90%, 1.5 nM; $n = 5$). n_H was in the range 0.9–1.2. **b**, $pH_{IC_{50}}$ of receptors incorporating NR1wt and the indicated NR2 subunits. See Supplementary Table 2 for values. Two asterisks, $P < 0.001$. **c**, Proton sensitivity of NR1wt/NR2B-Y282C receptors before ($pH_{IC_{50}} = 7.70$, $n_H = 1.5$; $n = 3$) and after ($pH_{IC_{50}} = 7.34$, $n_H = 1.4$; $n = 3$) modification by MTS-PtrEA. Error bars represent s.d.

©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

NTD-ABD linker for communication between the NTD and the gating machinery.

Protons are another allosteric modulator that differentially inhibit NMDAR subtypes[1]. In contrast with the zinc sensor, the proton sensor is thought to be closely associated with the channel gate[28]. Unexpectedly, deleting the NR2-NTDs fully abolished the difference in pH sensitivity between wild-type NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors (Fig. 3b). Moreover, swapping the NTD+L region between NR2A and NR2B reversed their pH sensitivities, whereas grafting the NR2A NTD+L region onto NR2D decreased its proton sensitivity towards that of NR2Awt-containing receptors (Fig. 3b). Proton sensitivity was also decreased when the NR2B-Y282C NTD was locked open with MTS-PtrEA (Fig. 3c). Therefore the NR2 dependence of pH sensitivity is unlikely to result from an intrinsic difference in the proton sensor between NR1/NR2 receptor subtypes, but rather from differential access to the proton-binding site owing to the influence of NR2-NTD on channel activity.

Our study reveals that the large differences in channel activity conferred by the various NR2 NMDAR subunits originate from a region remote from the agonist-binding/channel gating core. This region comprises the large NR2-NTD and the short linker connecting the NR2-NTD to the ABD. The bilobate NR2-NTD oscillates spontaneously between open-cleft and closed-cleft conformations (Fig. 4), the latter triggering disruption of the ABD dimer interface and subsequent channel closure[20]. The NTD-ABD linker could exert its key influence by tuning the equilibrium between the different conformations of the NR2-NTD. The identity of the NR2-NTD+L region also determines the sensitivity to zinc and protons, two endogenous allosteric inhibitors of NMDARs that are likely to be critical in the regulation of NMDAR activity under physiological and pathological conditions[1,3]. Through its dynamic conformational equilibrium, the NR2-NTD could serve as a target for either negative or positive subunit-specific allosteric modulators (Fig. 4). Compounds such as ifenprodil, which bind the NTD cleft and promote its closure (NTD 'closers'), behave as subunit-specific NMDAR inhibitors and show good efficacy as neuroprotectants[2]. We propose that molecules that bind the same cleft but impede its closure (NTD 'openers') would behave as NMDAR potentiators (Fig. 4). Such molecules may prove to be of significant therapeutic benefit, given the accumulating evidence that major human psychoses, including schizophrenia, are associated with a deficit of NMDAR activity[2,29].

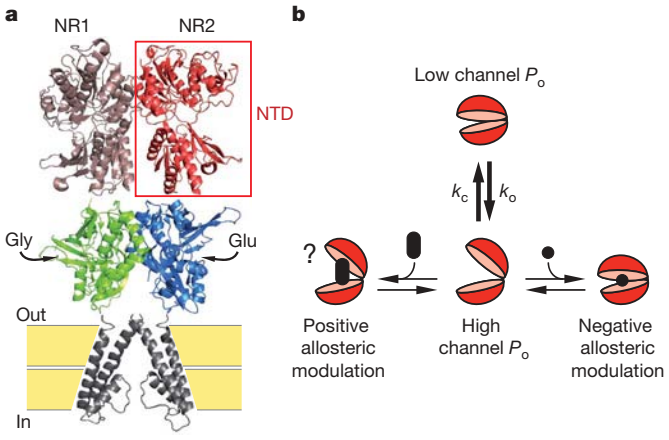


Figure 4 | Model for the control of NMDAR activity by the N-terminal domain of NR2. a, Structural depiction of an NMDAR. The full receptor is a tetramer, but only an NR1/NR2 dimer is shown[30]. **b**, In its ligand-free state, the NR2-NTD alternates between open-cleft and closed-cleft conformations, the latter favouring pore closure. In the model, this equilibrium determines the subtype specificity of NMDAR P_o; k_o/k_c(NR2B) < k_o/k_c(NR2A). The NTD is also the target of subunit-specific allosteric inhibitors such as zinc[12–14,19] or ifenprodil[15,25], which bind the central cleft of the NTD and promote domain closure. We propose that a molecule binding in the same cleft, but preventing its closure, behaves as a positive allosteric modulator, enhancing receptor activity.

METHODS SUMMARY

Complementary DNA constructs and site-directed mutagenesis. The pcDNA3-based expression plasmids, mutagenesis and sequencing procedure have been described previously[19]. Chimaeras were obtained by classical amplification by polymerase chain reaction and subsequent subcloning into the parental clone.

Electrophysiology. Recombinant NMDARs were expressed in *Xenopus laevis* oocytes after simultaneous injection of cDNAs (at 10 ng μl^{-1}; nuclear injection) coding for the various NR1 and NR2 subunits (ratio 1:1). Oocytes were prepared, injected, voltage-clamped and superfused as described previously[12].

Single channels were recorded from human embryonic kidney (HEK)-cell outside-out patches.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 1 December 2008; accepted 16 March 2009.
Published online 29 April 2009.

1. Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D. & Traynelis, S. F. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.* **51,** 7–61 (1999).
2. Kemp, J. A. & McKernan, R. M. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nature Neurosci.* **5** (Suppl.), 1039–1042 (2002).
3. Paoletti, P. & Neyton, J. NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7,** 39–47 (2007).
4. Cull-Candy, S. G. & Leszkiewicz, D. N. Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE* **2004,** re16 (2004).
5. Chen, N., Luo, T. & Raymond, L. A. Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *J. Neurosci.* **19,** 6844–6854 (1999).
6. Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J. & Traynelis, S. F. Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J. Physiol. (Lond.)* **563,** 345–358 (2005).
7. Wyllie, D. J., Behe, P. & Colquhoun, D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *J. Physiol. (Lond.)* **510,** 1–18 (1998).
8. Dravid, S. M., Prakash, A. & Traynelis, S. F. Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *J. Physiol. (Lond.)* **586,** 4425–4439 (2008).
9. Popescu, G., Robert, A., Howe, J. R. & Auerbach, A. Reaction mechanism determines NMDA receptor response to repetitive stimulation. *Nature* **430,** 790–793 (2004).
10. Liu, Y. *et al.* NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo*. *J. Neurosci.* **27,** 2846–2857 (2007).
11. Liu, L. *et al.* Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* **304,** 1021–1024 (2004).
12. Paoletti, P. *et al.* Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28,** 911–925 (2000).
13. Low, C. M., Zheng, F., Lyuboslavsky, P. & Traynelis, S. F. Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of *N*-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **97,** 11062–11067 (2000).
14. Choi, Y. B. & Lipton, S. A. Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn^{2+} inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23,** 171–180 (1999).
15. Perin-Dureau, F., Rachline, J., Neyton, J. & Paoletti, P. Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J. Neurosci.* **22,** 5955–5965 (2002).
16. Jones, K. S., VanDongen, H. M. & VanDongen, A. M. The NMDA receptor M3 segment is a conserved transduction element coupling ligand binding to channel opening. *J. Neurosci.* **22,** 2044–2053 (2002).
17. Yuan, H., Erreger, K., Dravid, S. M. & Traynelis, S. F. Conserved structural and functional control of *N*-methyl-D-aspartate receptor gating by transmembrane domain M3. *J. Biol. Chem.* **280,** 29708–29716 (2005).
18. Blanke, M. L. & VanDongen, A. M. Constitutive activation of the *N*-methyl-D-aspartate receptor via cleft-spanning disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* **283,** 21519–21529 (2008).
19. Rachline, J., Perin-Dureau, F., Le Goff, A., Neyton, J. & Paoletti, P. The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J. Neurosci.* **25,** 308–317 (2005).
20. Gielen, M. *et al.* Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron* **57,** 80–93 (2008).
21. Sun, Y. *et al.* Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417,** 245–253 (2002).
22. Mayer, M. L. Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440,** 456–462 (2006).
23. Tang, C., Schwieters, C. D. & Clore, G. M. Open-to-closed transition in apo maltose-binding protein observed by paramagnetic NMR. *Nature* **449,** 1078–1082 (2007).

©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

24. Kniazeff, J. *et al.* Locking the dimeric $GABA_B$ G-protein-coupled receptor in its active state. *J. Neurosci.* **24,** 370–377 (2004).
25. Mony, L. *et al.* Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by *N*-methyl-D-aspartate receptors. *Mol. Pharmacol.* **75,** 60–74 (2009).
26. Zheng, F. *et al.* Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand binding domain of NR2A. *Nature Neurosci.* **4,** 894–901 (2001).
27. Marvin, J. S. & Hellinga, H. W. Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling. *Nature Struct. Biol.* **8,** 795–798 (2001).
28. Low, C. M. *et al.* Molecular determinants of proton-sensitive *N*-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol. Pharmacol.* **63,** 1212–1222 (2003).
29. Lisman, J. E. *et al.* Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **31,** 234–242 (2008).
30. Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R. & Gouaux, E. Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438,** 185–192 (2005).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank B. Barbour, P.-J. Corringer, J. Neyton and D. Stroebel for comments on the manuscript, and S. Carvalho, M. Casado and M. Gendrel for experimental help. This work was supported by the Ministère de la Recherche (M.G., L.M.), the Université Pierre et Marie Curie (UPMC) and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (M.G.), NIH grant R01 MH045817 (J.W.J.), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Agence Nationale pour la Recherche (ANR), GlaxoSmithKline and an Équipe FRM grant (P.P.).

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.P. (paoletti@biologie.ens.fr).

©2009 **Macmillan Publishers Limited. All rights reserved**

METHODS

Two electrode voltage-clamp recordings and analysis. For all experiments, except those aimed at measuring pH sensitivity, the standard external solution contained (in mM): 100 NaCl, 2.5 KCl, 0.3 $BaCl_2$, 5 HEPES; pH adjusted to 7.3 with NaOH. To chelate trace amounts of contaminant zinc, diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) (10 μM) was added to all the '0' zinc solutions[31]. For free zinc concentrations in the range 1 nM–1 μM, tricine (10 mM) was used to buffer zinc, whereas *N*-[2-acetamido]-iminodiacetic acid (ADA) (1 mM) was used to buffer zinc in the 0.1–100 nM range[20]. For the pH sensitivity experiments, an enriched HEPES external solution was used to ensure proper pH buffering[20]. Currents were elicited by the simultaneous application of saturating concentrations of glutamate and glycine (100 μM each), and measured at a holding potential of −60 mV. MTS compounds were used at 0.2 mM (except in Supplementary Fig. 7). Experiments were performed at room temperature (18–25 °C). Data collection and analysis of pH and zinc dose–response curves were performed as described in ref. 20. MK-801 time constants of inhibition were obtained by fitting currents with a single-exponential component within a time window corresponding to 10–90% of the maximal inhibition. Data points used for statistical tests were assumed log-normally distributed before performing a Student's *t*-test (unless otherwise indicated).

Single-channel recordings and analysis. HEK cells were transfected with 2 μg of cDNAs mixed in a ratio of 1 NR1:3 NR2:3 green fluorescent protein (GFP), using calcium phosphate precipitation or FuGENE Transfection Reagent (Roche). Positive cells were revealed by GFP epifluorescence. Patch pipettes of 5–10 MΩ were filled with a solution containing (in mM): 115 CsF, 10 CsCl, 10 HEPES, 10 EGTA; pH adjusted to 7.15 with CsOH. The osmolality was 270 mosmol kg^{-1}. The standard external solution contained (in mM): 140 NaCl, 2.8 KCl, 0.5 $CaCl_2$, 10 HEPES, 0.01 EDTA; pH adjusted to 7.3 with NaOH. Osmolality was adjusted to 290 mosmol kg^{-1} with sucrose. EDTA was added to chelate trace amounts of contaminant zinc[31]. Channel openings were activated by 100 μM glycine, with 0.05 or 0.01 μM glutamate in most experiments, or with 100 μM glutamate in some patches (included only if no double openings were observed). The holding potential (after correction for junction potential) was −80 to −90 mV. Experiments were performed at room temperature. Currents were recorded with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices), sampled at 20–50 kHz, low-pass filtered (eight-pole Bessel) at 5–10 kHz. Before analysis of P_o within a burst, data were digitally refiltered to give a cascaded low-pass filter cutoff frequency of 2 kHz. pClamp 9 or 10 (Molecular Devices) was used to acquire and analyse the data.

The principal goal of single-channel analysis was to measure the open probability (P_o) within bursts of channel openings, which provides a good estimate of P_o within an NMDAR activation[6,32,33]. To idealize single-channel data, transitions were detected by using a 50% threshold criterion[34]. Events of 200 μs duration or less were excluded from analysis. Missing and ignoring brief events can significantly influence dwell-time histograms. However, such brief events contribute only a tiny fraction of the total time that a channel spends open or closed. Thus, missed events should not have significantly affected measurements of P_o. Histograms are presented as square root versus log(time) plots[35]. Shut-time histograms were fitted with three or four exponential components. A burst was defined as a series of openings separated by closures of duration less than a critical duration, T_{crit}. Bursts with two levels of openings were discarded. We calculated T_{crit} between the two longest components of the shut-time histograms so that total number of event misclassifications was minimized[34,36]. For NR1wt/NR2Awt and NR1wt/NR2B-(2A NTD+L) receptors, the two longest components of the shut-time distribution differed by a mean factor of more than 390, whereas these components were less separated for NR1wt/NR2Bwt and NR1wt/NR2A-(2B NTD+L) (23-fold and 54-fold separation, respectively). For the latter two constructs, the separation between shut-time components results in a greater than desired number of misclassification of shut times[34]. This may have led to an overestimation of the P_o within a burst. However, for wild-type receptors, our data are consistent overall with previous results[6,33], suggesting that our estimates of P_o are reliable.

Chemicals. HEPES, L-glutamate, glycine, DTPA, EDTA, tricine and ADA were obtained from Sigma, D-APV from Ascent Scientific, 2-aminoethylmethanethiosulphonatehydrobromide (MTSEA), 2-(trimethylammonium)ethylmethanethiosulphonatebromide (MTSET) and 3-(triethylammonium)propylmethanethiosulphonatebromide (MTS-PtrEA) from Toronto Research Chemicals, and (+)-MK-801 from Tocris. MTS compounds were prepared as 40 mM stock solutions in doubly distilled water, aliquoted in small volumes (50 μl) and stored at −20 °C; aliquots were thawed just before use.

Construction of Fig. 4. The molecular architecture shown in Fig. 4a was illustrated by the crystal structure of the mGluR1 ligand-binding domain dimer (PDB 1ewv, ref. 37) at the level of the NTD, the NMDAR NR1/NR2A agonist-binding domain dimer (PDB 2a5T, ref. 30) and two subunits of the KcsA tetramer (PDB 1bl8, ref. 38) as the transmembrane region of the receptor. The third transmembrane segment and the C-terminal cytoplasmic region are lacking in this structural depiction.

31. Paoletti, P., Ascher, P. & Neyton, J. High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J. Neurosci.* **17,** 5711–5725 (1997).
32. Erreger, K. & Traynelis, S. F. Zinc inhibition of rat NR1/NR2A *N*-methyl-D-aspartate receptors. *J. Physiol. (Lond.)* **586,** 763–778 (2008).
33. Schorge, S., Elenes, S. & Colquhoun, D. Maximum likelihood fitting of single channel NMDA activity with a mechanism composed of independent dimers of subunits. *J. Physiol. (Lond.)* **569,** 395–418 (2005).
34. Colquhoun, D. & Sigworth, F. J. in *Single-channel Recording* (eds Sakmann, B. & Neher, E.) 483–587 (Plenum, 1995).
35. Sigworth, F. J. & Sine, S. M. Data transformations for improved display and fitting of single-channel dwell time histograms. *Biophys. J.* **52,** 1047–1054 (1987).
36. Jackson, M. B., Wong, B. S., Morris, C. E., Lecar, H. & Christian, C. N. Successive openings of the same acetylcholine receptor channel are correlated in open time. *Biophys. J.* **42,** 109–114 (1983).
37. Kunishima, N. *et al.* Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature* **407,** 971–977 (2000).
38. Doyle, D. A. *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K^+ conduction and selectivity. *Science* **280,** 69–77 (1998).

©2009 Macmillan Publishers Limited. All rights reserved

Table S1. Effects of MTS modification on receptors incorporating NR1wt and the indicated NR2 mutant

NR2 mutant	Relative current (mean ± s.d.)		
	post MTSEA	post MTSET	post MTS-PtrEA
NR2B mutant			
H127C	1.13 ± 0.03 (n=5)	1.29 ± 0.06 (n=5)	1.58 ± 0.10 (n=8)
H127A	0.93 ± 0.01 (n=7)	0.84 ± 0.03 (n=5)	0.74 ± 0.01 (n=5)
Y282C	2.1 ± 0.1 (n=10)	4.4 ± 0.6 (n=10)	5.5 ± 1.0 (n=33)
Y282S	0.91 ± 0.02 (n=4)	0.92 ± 0.03 (n=4)	0.92 ± 0.02 (n=4)
NR2A mutant			
H128C	0.74 ± 0.01 (n=6)	0.83 ± 0.02 (n=8)	0.91 ± 0.10 (n=10)
H128S	0.80 ± 0.01 (n=4)	0.76 ± 0.01 (n=4)	0.84 ± 0.07 (n=6)
Y281C	1.02 ± 0.02 (n=12)	1.09 ± 0.04 (n=6)	0.95 ± 0.03 (n=6)
Y281A	0.60 ± 0.06 (n=12)	0.58 ± 0.04 (n=6)	0.58 ± 0.03 (n=5)

Table S2. pH sensitivity of receptors incorporating NR1wt and the indicated NR2 construct

NR2 construct	pH_{IC50}
NR2Awt	6.93 ± 0.02 (n=9)
NR2Bwt	7.50 ± 0.03 (n=5)
NR2A-ΔNTD	7.11 ± 0.09 (n=9)
NR2B-ΔNTD	7.14 ± 0.03 (n=6)
NR2A-(2B NTD+L)	7.26 ± 0.03 (n=4)
NR2B-(2A NTD+L)	7.02 ± 0.02 (n=4)
NR2Dwt	7.52 ± 0.03 (n=10)
NR2D-(2A NTD+L)	7.13 ± 0.01 (n=5)

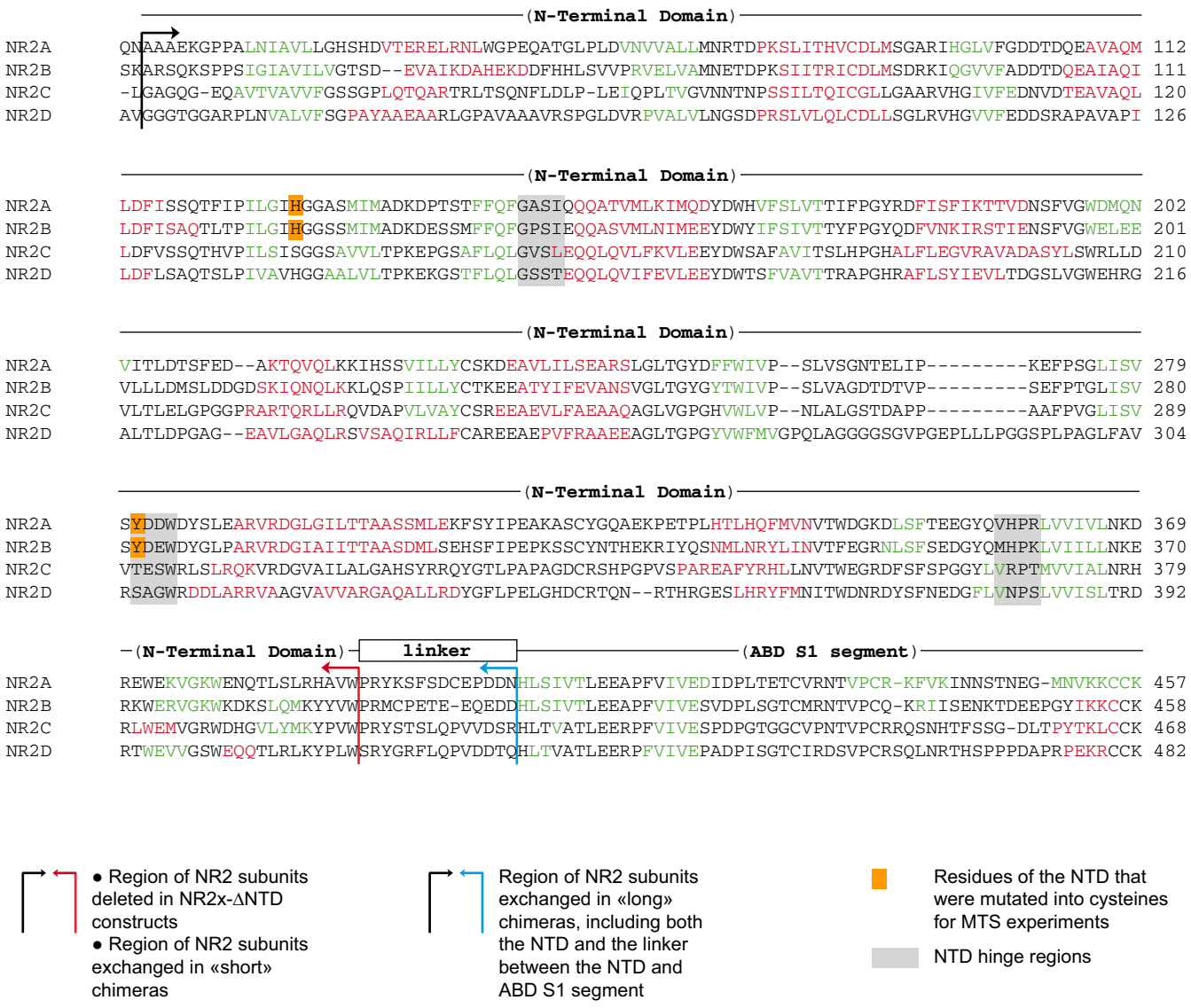


Figure S1. Sequence alignment of the NTD+linker region of NR2A-D subunits

The indicated α-helices (red) and β-strands (green) of NR2 subunits were predicted as described in ref. 25.

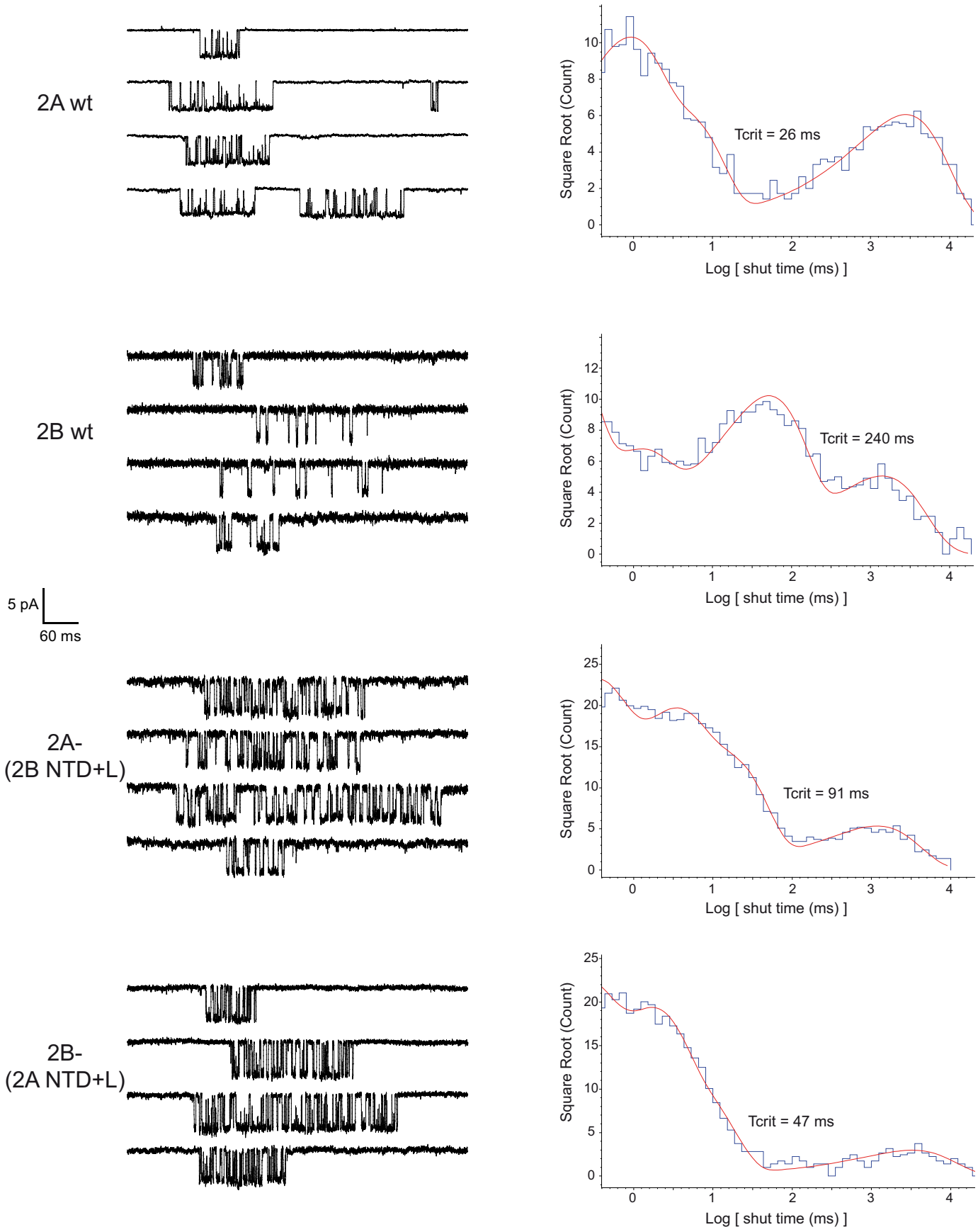


Figure S2. Effect of NR2A/B NTD+L chimeras on single-channel activity

Representative bursts of openings (left) and shut-time distribution histograms (right) from outside-out patches expressing either NR1wt/NR2Awt, NR1wt/NR2Bwt, NR1wt/NR2A-(2B NTD+L) and NR1wt/NR2B-(2A NTD+L). The value of Tcrit used to define bursts is indicated for each histogram.

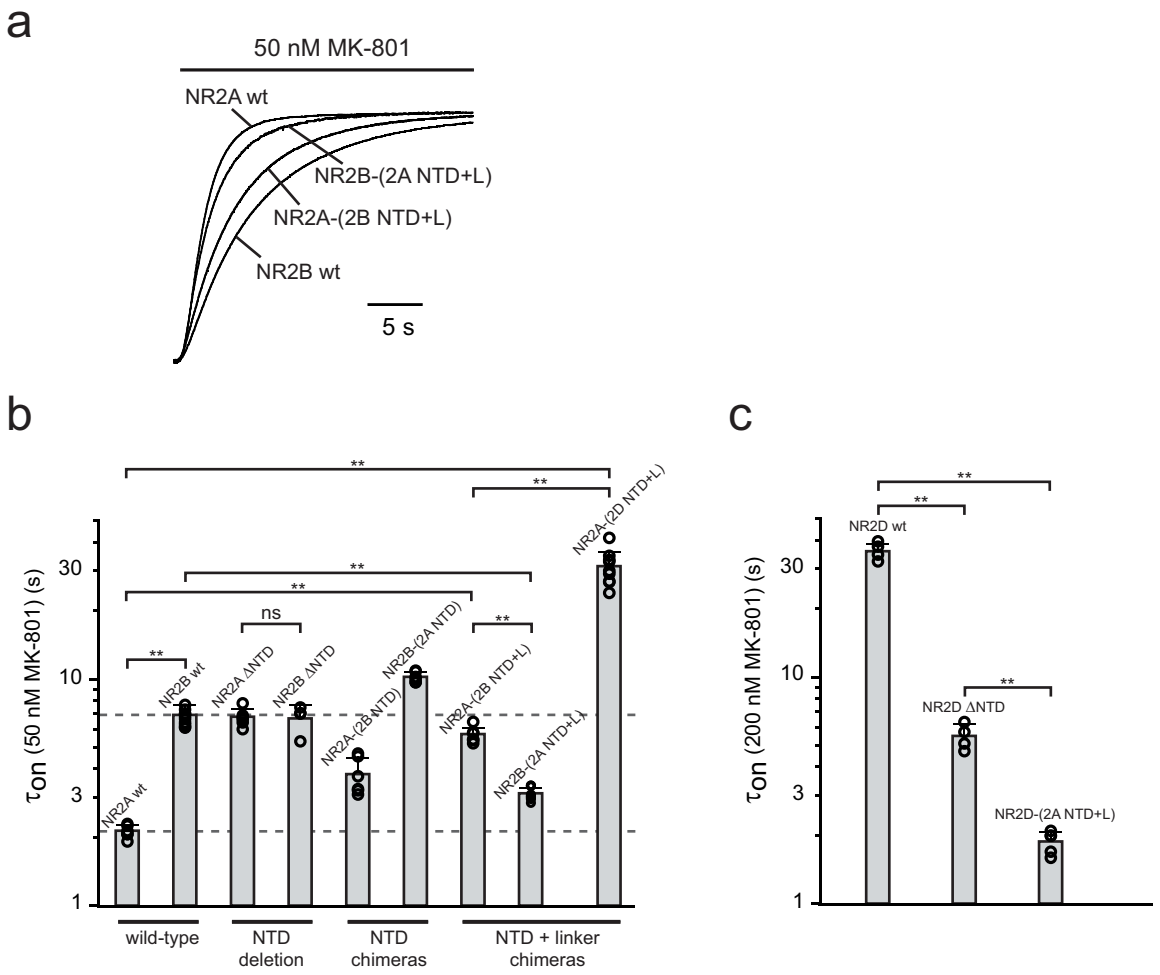


Figure S3. Kinetics of MK-801 inhibition reveal that NMDAR Po heterogeneity is controlled by the NR2 NTD+linker region

a Kinetics of inhibition by 50 nM MK-801 of receptors incorporating NR1wt together with NR2Awt (τ_{on} = 2.0 s), NR2Bwt (6.9 s), NR2A-(2B NTD+L) (5.1 s) or NR2B-(2A NTD+L) (2.8 s). **b** Bar graph showing the time constant of inhibition by 50 nM MK-801 of receptors incorporating NR1wt together with NR2Awt (τ_{on} = 2.1 +/- 0.1 s [n=6]), NR2Bwt (6.9 +/- 0.7 s [n=10]), NR2A-ΔNTD (6.8 +/- 0.6 s [n=6]), NR2B-ΔNTD (6.7 +/- 1.0 s [n=4]), NR2A-(2B NTD) (3.8 +/- 0.3 s [n=6]), NR2B-(2A NTD) (10.2 +/- 0.5 s [n=6]), NR2A-(2B NTD+L) (5.7 +/- 0.4 s [n=6]), NR2B-(2A NTD+L) (3.1 +/- 0.2 [n=9]) or NR2A-(2D NTD+L) (31.4 +/- 4 .9 s [n=10]) (**p<0.001). **c** Bar graph showing the time constant of inhibition by 200 nM MK-801 of receptors incorporating NR1wt together with NR2Dwt (36 +/- 3 s [n=5]), NR2D-ΔNTD (5.5 +/- 0.7 s [n=6]) or NR2D-(2A NTD+L) (1.9 +/- 0.2 [n=5]). Error bar represent s.d.

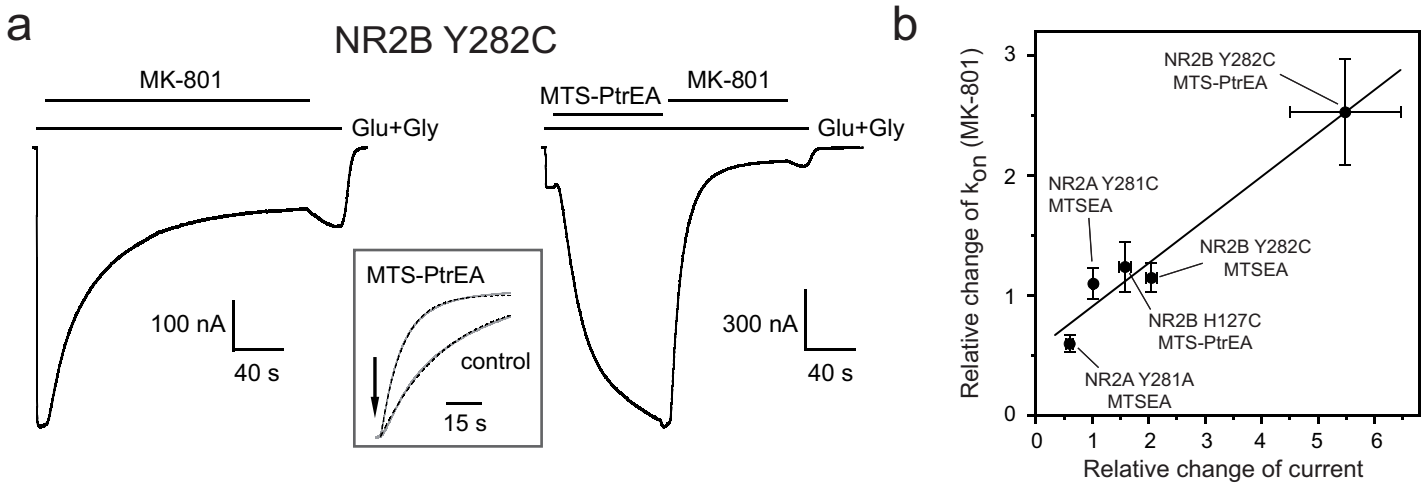


Figure S4. Locking open the NR2-NTD increases the onset of MK-801 inhibition

a Recordings showing the inhibition by 50 nM MK-801 of NR1wt/NR2B-Y282C receptors in the presence of 100 μM glutamate and 100 μM glycine before (left panel) and after (right panel) modification by 0.2 mM MTS-PtrEA. *Inset:* onsets of MK-801 inhibition shown in panel *a* were fitted with a single exponential (τ_{on} = 9.7 s before and 30 s after MTS-PtrEA). **b** The MTS-induced relative change of the MK-801 on-rate is plotted versus the MTS-induced relative change of the current for NR1wt/NR2A-Y281A (0.60 +/- 0.07 [n=4] vs 0.60 +/- 0.02 [n=12] with MTSEA, respectively), NR1wt/NR2A-Y281C (1.10 +/- 0.13 [n=4] vs 1.02 +/- 0.06 [n=12] with MTSEA, respectively), NR1wt/NR2B-H127C (1.24 +/- 0.21 [n=4] vs 1.58 +/- 0.10 [n=8] with MTS-PtrEA, respectively) and NR1wt/NR2B-Y282C (1.15 +/- 0.12 [n=4] vs 2.1 +/- 0.1 [n=9] with MTSEA, respectively; and 2.5 +/- 0.4 [n=4] vs 5.5 +/- 1.0 [n=33] with MTS-PtrEA, respectively). The line represents a linear regression fit of the data points. The R value of the fit is 0.98. Error bars represent s.d.

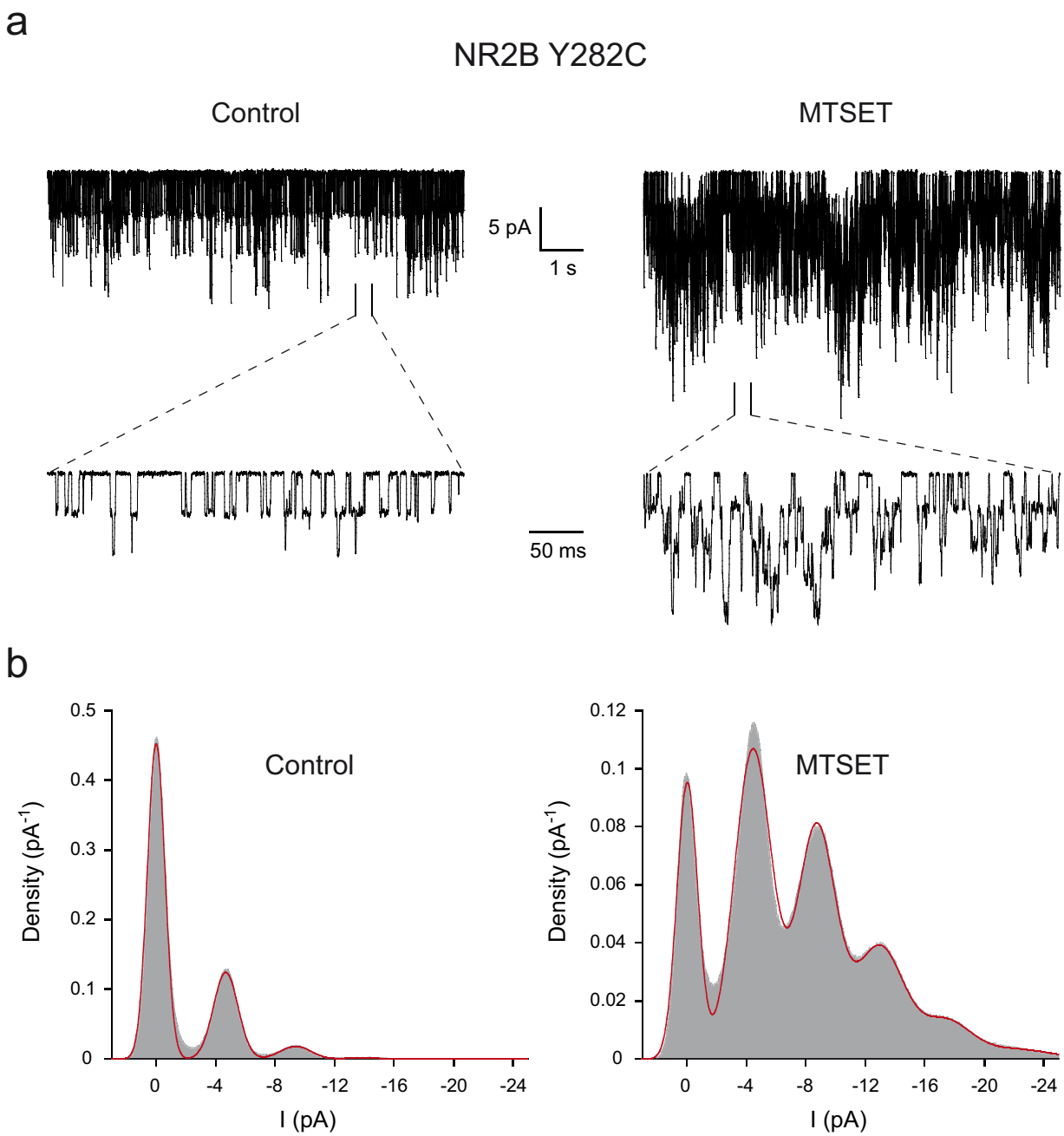


Figure S5. Locking open the NR2-NTD increases single-channel activity

a Single-channel recordings of an outside-out patch from a HEK cell expressing NR1wt/NR2B-Y282C receptors, in the presence of 100 μM glutamate and 100 μM glycine, before (left) and during (right) application of 0.2 mM MTSET (same patch). Bottom traces display time-expanded views. **b** All-points amplitude histograms from the patch recorded in *a*. Data (gray filling) were fitted with multiple gaussian components (red lines), amplitude of which enabled the calculation of N*Po before and during MTSET application. Similar results were obtained with 3 patches, yielding a mean potentiation of Po by MTSET of 3.4 ± 0.5 (s.e.m.). Data were filtered at 5 kHz for analysis and at 1 kHz for display.

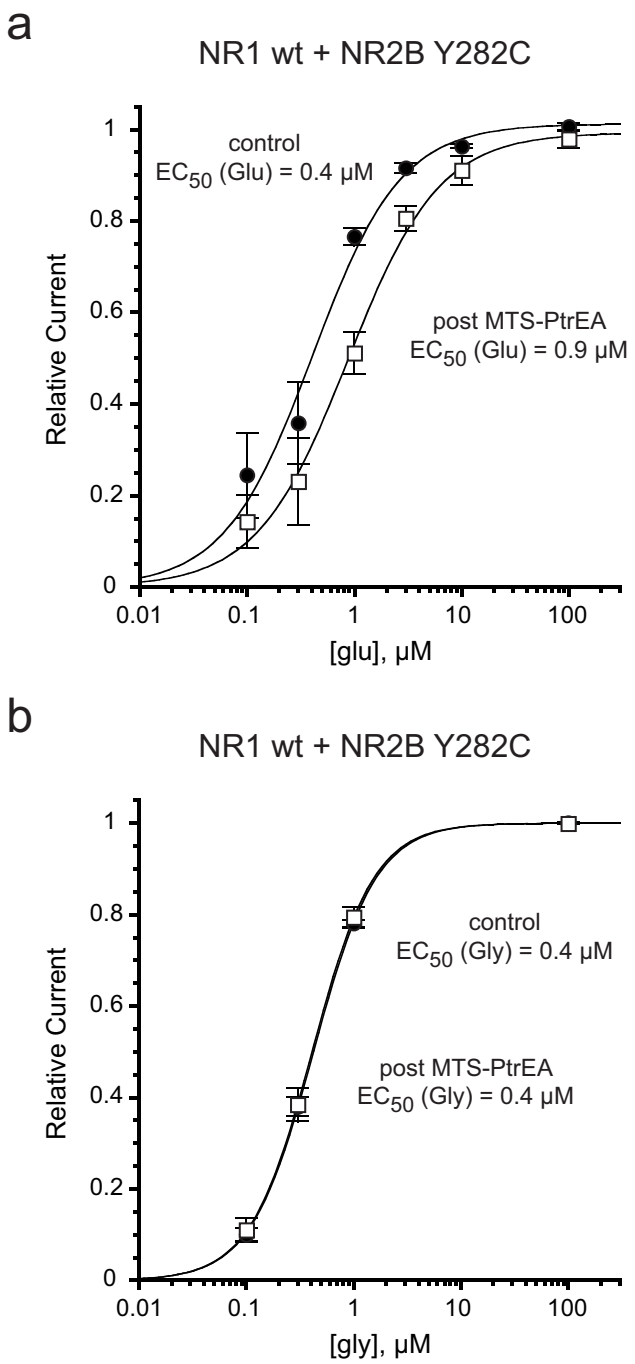


Figure S6. Effect of MTS modification of NR1wt/NR2B-Y282C receptors on glutamate and glycine sensitivities

a Glutamate dose-response curves of NR1wt/NR2B-Y282C receptors in the presence of 100 µM glycine before (EC_{50} = 0.38 µM, n_H = 1.2 [n = 9]; black-filled circles) and after (EC_{50} = 0.9 µM, n_H = 1.0 [n = 9]; open squares) modification by 0.2 mM MTS-PtrEA. **b** Glycine dose-response curves of NR1wt/NR2B-Y282C receptors in the presence of 100 µM glutamate before (EC_{50} = 0.4 µM, n_H = 1.5 [n = 4]; black-filled circles) and after (EC_{50} = 0.4 µM, n_H = 1.5 [n = 9]; open squares) modification by 0.2 mM MTS-PtrEA. Error bars represent s.d.

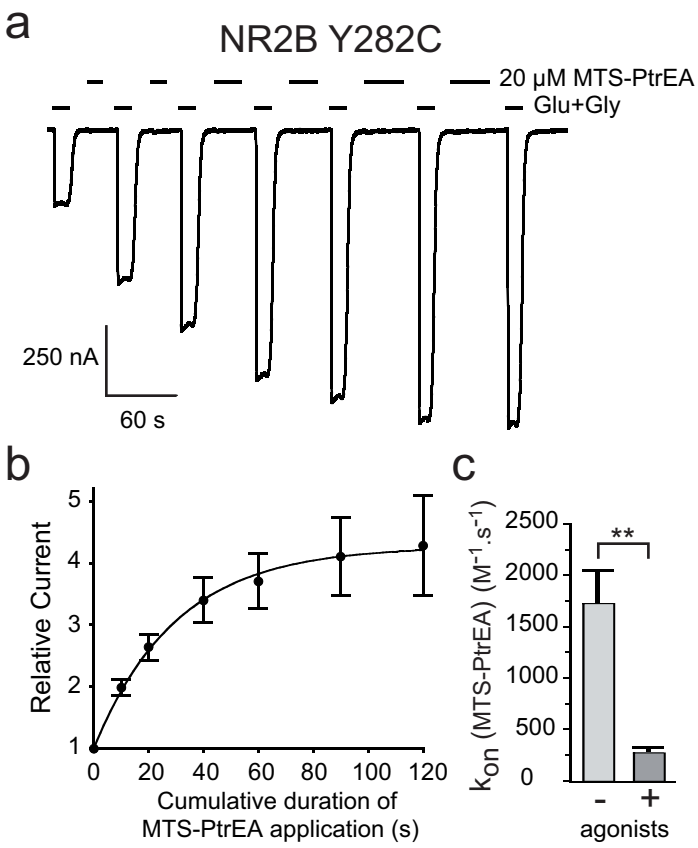


Figure S7. MTS-PtrEA modification rate of NR1wt/NR2B-Y282C receptors is faster in the absence of agonists than in their presence

a Recordings showing the modification of NR1wt/NR2B-Y282C receptors by 20 μM MTS-PtrEA in the absence of glutamate and glycine. **b** The onsets of MTS-PtrEA modification were fitted with a single exponential (τ_{on} = 30 +/- 6 s, [n=5]). **c** Mean reaction rate of MTS-PtrEA modification at NR1wt/NR2B-Y282C in the absence or in the presence of 100 μM glutamate and 100 μM glycine (1700 +/- 300 $M^{-1}.s^{-1}$ [n=5] and 280 +/- 50 $M^{-1}.s^{-1}$ [n=17], respectively) (**p<0.001, Student's t-test). Error bars represent s.d.

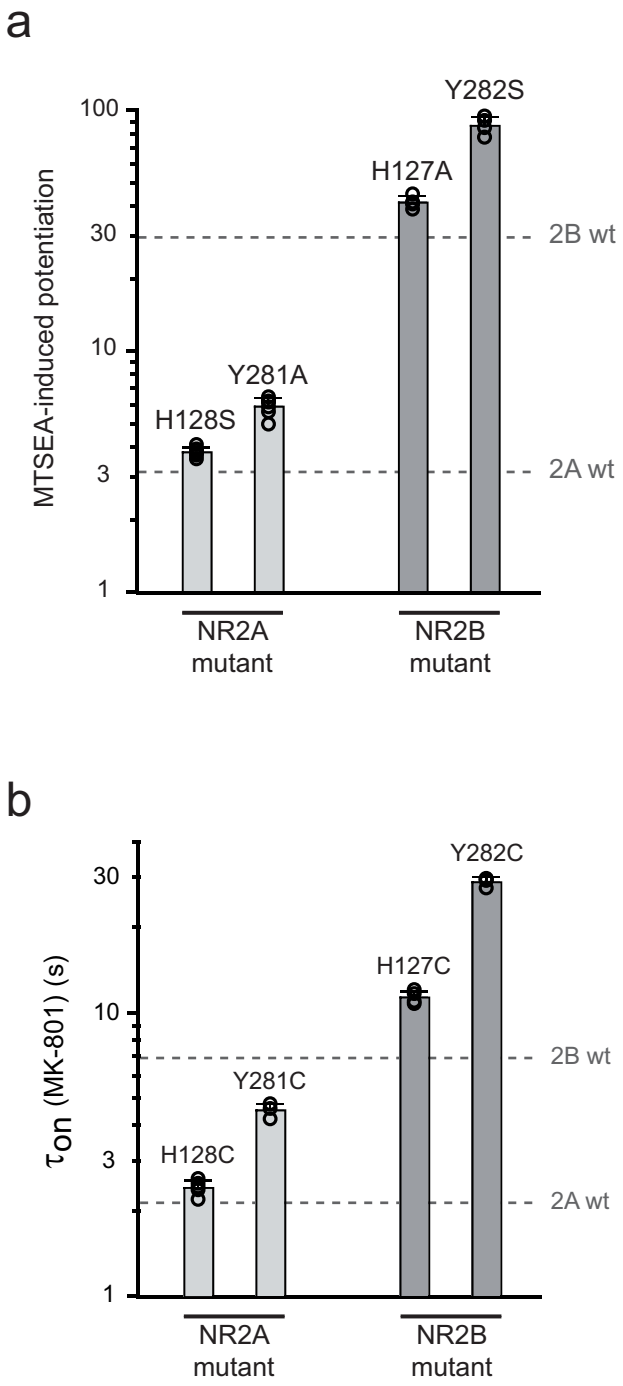


Figure S8. Effect of NR2-NTD mutations on receptor activity

a Bar graph showing the MTSEA-induced potentiations of receptors incorporating NR1-A652C together with NR2A-H128S (3.8 +/- 0.2, [n=7]), NR2A-Y281A (6.0 +/- 0.5, [n=7]), NR2B-H127A (42 +/- 2, [n=5]) or NR2B-Y282S (87 +/- 7, [n=3]). **b** Bar graph showing the onset of inhibition by 50 nM MK-801 of receptors incorporating NR1wt together with NR2A-H128C (2.4 +/- 0.2 s, [n=5]), NR2A-Y281C (4.6 +/- 0.2 s, [n=4]), NR2B-H127C (11.4 +/- 0.5 s, [n=4]) or NR2B-Y282C (29.1 +/- 0.9 s, [n=4]). Error bars represent s.d.

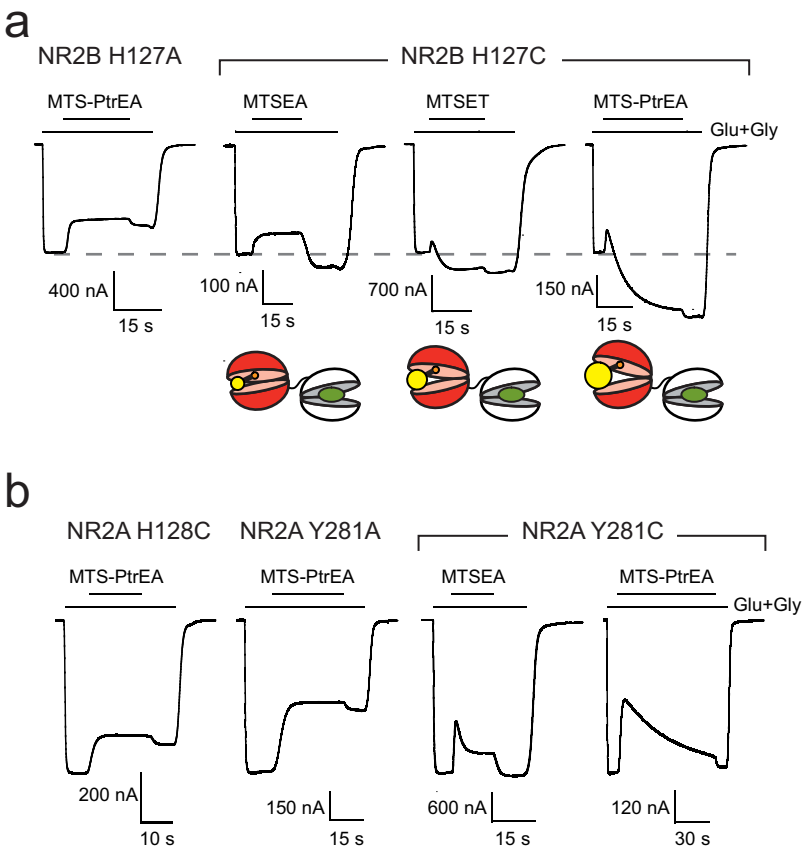


Figure S9. Effect of MTS modification at NR2B-H127, NR2A-Y281 and NR2A-H128 mutated receptors

a Recordings from NR1wt/NR2B-H127C and NR1wt/NR2B-H127A receptors during treatment by 0.2 mM of the indicated MTS compounds. **b** Recordings from NR1wt/NR2A-H128C, NR1wt/NR2A-Y281A and NR1wt/NR2A-Y281C receptors during treatment by 0.2 mM of the indicated MTS compound. Note that the MTS-potentiating effects are specific to the cysteine mutation introduced, since no potentiation were observed with the non-reactive serine or alanine control mutants, but rather an inhibition (likely due to the modification of an endogenous cysteine).

7.8 Revue

Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors : molecular mechanism and therapeutic potential

Laetitia Mony, James N.C. Kew, Martin J. Gunthorpe, and Pierre Paoletti

British Journal of Pharmacology 157 (2009) 1301–1317

BJP BRITISH JOURNAL OF PHARMACOLOGY

BPS BRITISH PHARMACOLOGICAL SOCIETY

British Journal of Pharmacology (2009), 157, 1301–1317
© 2009 The Authors
Journal compilation © 2009 The British Pharmacological Society All rights reserved
0007-1188/09
www.brjpharmacol.org

REVIEW

Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential

Laetitia Mony[1], James NC Kew[2], Martin J Gunthorpe[2] and Pierre Paoletti[1]

[1]*Laboratoire de Neurobiologie, Ecole Normale Supérieure, CNRS, Paris, France, and* [2]*Neurosciences CEDD, GlaxoSmithKline, Harlow, Essex, UK*

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are ion channels gated by glutamate, the major excitatory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). They are widespread in the CNS and are involved in numerous physiological and pathological processes including synaptic plasticity, chronic pain and psychosis. Aberrant NMDAR activity also plays an important role in the neuronal loss associated with ischaemic insults and major degenerative disorders including Parkinson's and Alzheimer's disease. Agents that target and alter NMDAR function may, thus, have therapeutic benefit. Interestingly, NMDARs are endowed with multiple extracellular regulatory sites that recognize ions or small molecule ligands, some of which are likely to regulate receptor function *in vivo*. These allosteric sites, which differ from agonist-binding and channel-permeation sites, provide means to modulate, either positively or negatively, NMDAR activity. The present review focuses on allosteric modulation of NMDARs containing the NR2B subunit. Indeed, the NR2B subunit confers a particularly rich pharmacology with distinct recognition sites for exogenous and endogenous allosteric ligands. Moreover, NR2B-containing receptors, compared with other NMDAR subtypes, appear to contribute preferentially to pathological processes linked to overexcitation of glutamatergic pathways. The actions of extracellular H^+, Mg^{2+}, Zn^{2+}, of polyamines and neurosteroids, and of the synthetic compounds ifenprodil and derivatives ('prodils') are presented. Particular emphasis is put upon the structural determinants and molecular mechanisms that underlie the effects exerted by these agents. A better understanding of how NR2B-containing NMDARs (and NMDARs in general) operate and how they can be modulated should help define new strategies to counteract the deleterious effects of dysregulated NMDAR activity.
British Journal of Pharmacology (2009) **157,** 1301–1317; doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00304.x; published online 8 July 2009

Keywords: NMDA; glutamate receptors; NR2B; allosteric modulators; excitotoxicity; neuropathic pain

Abbreviations: 3α5βS, 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one sulphate; NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptors; NTD, N-terminal domain; PS, pregnenolone sulphate; QBP, glutamine-binding protein

Molecular architecture of NMDA receptors

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are multisubunit complexes associating NR1, NR2 and, more rarely, NR3 subunits (also named GluN1, GluN2 and GluN3, respectively; Alexander *et al*. 2008). NR2 and NR3 subunits exist as four and two subtypes, respectively (NR2A-D and NR3A-B), each subtype being encoded by a distinct gene. NR1 exists as seven subtypes (NR1a–g), which are generated by alternative splicing from a single gene (Dingledine *et al*., 1999). Most NMDARs in the central nervous system (CNS) are comprised of NR1 and NR2 subunits forming a tetrameric complex of two NR1 and two NR2 subunits. Similarly to other glutamate-receptor ion channels (α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) and kainate receptors), NMDARs are thought to arrange and operate as dimer of dimers (Furukawa *et al*., 2005). The NR2 subunits that have differential developmental and anatomical profile are the major determinants of functional diversity by conferring on NMDARs' distinct biophysical and pharmacological properties (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004; Paoletti and Neyton, 2007).

Structurally, NMDAR subunits, like AMPA and kainate receptor subunits, share a common design and are organized into four different modules or units (Mayer, 2006; Paoletti and Neyton, 2007; Figure 1A): two large domains in the extracellular region, the N-terminal domain (NTD) and the agonist-binding domain (ABD, binding glycine in NR1 and

Correspondence: Dr Pierre Paoletti, Laboratoire de Neurobiologie, CNRS UMR 8544, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75005 Paris, France. E-mail: paoletti@biologie.ens.fr
Received 16 February 2009; revised 24 March 2009; accepted 26 March 2009

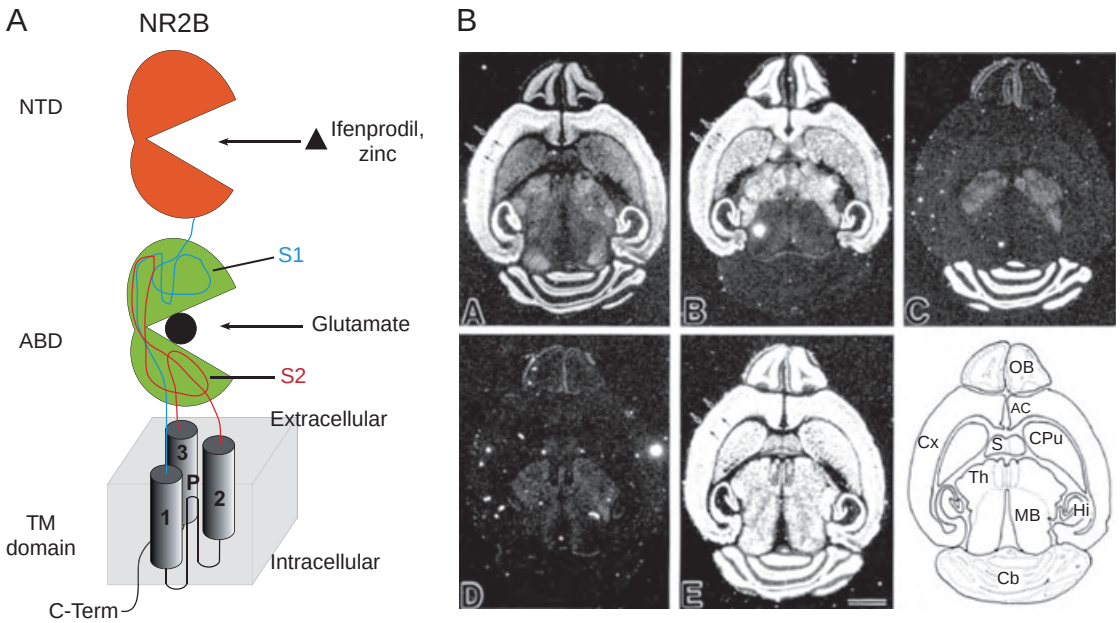


Figure 1 Organization and expression of NMDAR subunits. (A) Schematic representation of the NR2B subunit. It is composed of an NTD that binds allosteric inhibitors such as zinc and ifenprodil, an S1–S2 ABD (binds glutamate), a TM region (TM 1, 2, 3 and a re-entrant loop) that forms the ion channel and a C-terminal cytoplasmic region. (B) Distribution of NMDAR subunit mRNAs in the mouse brain at post-natal day 21 (figure reproduced with permission from Watanabe *et al.*, 1993). NR2A (panel A), NR2B (panel B), NR2C (panel C), NR2D (panel D) and NR1 (panel E). Note the restricted expression of the NR2B subunit in the forebrain. ABD, agonist-binding domain; AC, anterior cingulate cortex; Cx, cerebral cortex; Cb, cerebellum; CPu, caudate-putamen; Hi, hippocampal formation; MB, midbrain; NMDAR, N-methyl-D-aspartate; NTD, N-terminal domain; OB, olfactory bulb; S, septum; Th, thalamus; TM, transmembrane.

glutamate in NR2); the membrane region, comprising three transmembrane segments and a re-entrant loop that forms the ion channel and resembles an inverted K^+ channel; and the cytoplasmic region, comprising a C-terminal tail involved in cellular trafficking of the receptor and coupling to various intracellular signalling pathways.

The two extracellular domains, the NTD and the ABD, share homology with bacterial periplasmic proteins. The NTD, composed of the first 380 amino acids, is related to the leucine isoleucine valine binding protein (LIVBP; O'Hara *et al.*, 1993; Paoletti *et al.*, 2000) and plays an important role in subunit assembly (Herin and Aizenman, 2004). In NR2A and NR2B subunits, it also forms a regulatory domain, binding allosteric inhibitors (see below). Its structure has not been determined yet, but by homology to LIVBP, it is thought to exhibit a clamshell-like structure (Masuko *et al.*, 1999; Paoletti *et al.*, 2000). The ABD, which is related to the glutamine-binding protein, is also a bilobate domain. It is split in two discontinuous segments, S1 and S2, by insertion of the ion channel (Figure 1A). Several X-ray crystal structures of ABD of different ionotropic glutamate receptor (iGluR) subunits are now available, including those of NR1 and NR2A subunits complexed with glycine and glutamate respectively (Furukawa *et al.*, 2005). In all these structures, the agonist binds in the cleft of the clamshell, stabilizing a closed conformation of the two lobes. Competitive antagonists bind the same cleft but, in contrast to agonists, impede cleft closure, thus, preventing channel activation (Furukawa and Gouaux, 2003).

The mechanism that couples agonist binding to channel gate opening is partly known. ABD dimerization plays a key role in this process. Indeed, because two neighbouring ABDs are 'attached' one to the other through back-to-back apposition of their lobe 1, ABD closure induced by agonist binding can be transduced into tension onto the linkers connecting the ABDs to the channel. This in turn leads to channel opening (Mayer, 2006; see Figure 4B later). Breaking of the ABD dimer interface provides a means to relax this tension, and hence, close the channel. This process occurs during AMPA and kainate receptor desensitization (Sun *et al.*, 2002; Mayer, 2006) and during allosteric inhibition of NMDARs by protons and NTD ligands (Gielen *et al.*, 2008; see also, below and Figure 2B).

The NR2B subunit: expression and subcellular localization

While the NR1 subunit is expressed in virtually all neurons and at all developmental stages in the brain, NR2 subunit genes display different regional and developmental expression patterns. Thus, in the embryonic brain, NR2B and NR2D subunits predominate, while NR2A and NR2C are absent; in contrast, in the adult brain, NR2A predominates, being ubiquitously expressed, while NR2B expression is restricted to forebrain areas, and NR2C is highly enriched in the cerebellum (Watanabe *et al.*, 1992; Akazawa *et al.*, 1994; Monyer *et al.*, 1994, Figure 1B). Closer inspection of NR2B subunit gene expression in the rodent brain indicates that at E17, high levels of NR2B are present in the cortex (especially layer I), thalamus and spinal cord. In this latter region, NR2D is also strongly expressed. Around birth, NR2B expression is wide-

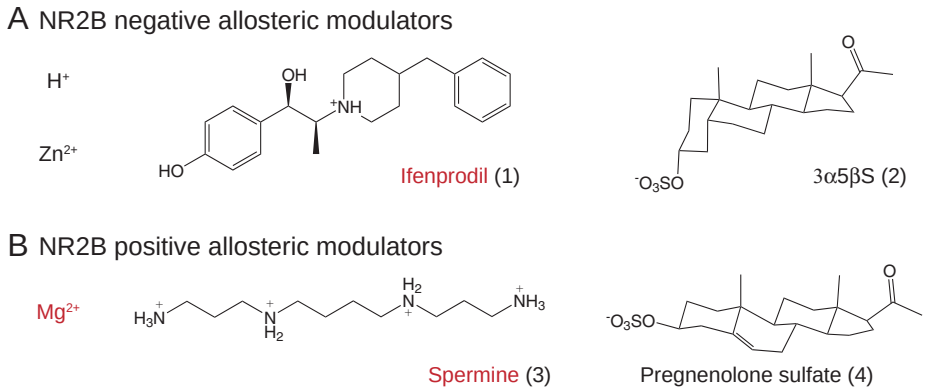


Figure 2 Positive and negative allosteric modulators of NR2B-containing NMDARs. (A) Allosteric modulators that inhibit NR2B-containing receptors. (B) Allosteric modulators that potentiate NR2B-containing receptors. The agents that selectively modulate NMDARs incorporating the NR2B subunit are named in red. NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptors; 3α5βS, 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one sulphate.

spread with strong expression levels in the cortex, hippocampus, septum, striatum and thalamic nuclei. NR2B is also present in the developing cerebellum, though at lower levels. NR2B expression peaks around P7–P10, at a stage where NR2A expression rises sharply while NR2D drops. The most striking change in the pattern of NR2B gene expression takes place between the first and second week post-natal and results in its almost complete disappearance from the cerebellum (while NR2C, and to a lesser extent, NR2A increase) together with a confinement to forebrain structures. In the cerebellum, this switch in NR2 subunit expression from NR2B to NR2A and NR2C has been shown to occur in the same cell population, the granule cells (Farrant *et al.*, 1994). In the adult brain, expression of NR2B is the highest in the cortex (most particularly layer II/III), hippocampus, amygdala, ventral nuclei of the thalamus and olfactory bulb (Watanabe *et al.*, 1993). Interestingly, in the adult spinal chord, NR2B expression is restricted to lamina 2 of the dorsal horn, a region that receives primary sensory afferents from nociceptors and thermoreceptors (Watanabe *et al.*, 1994). The restricted localization of NR2B-containing receptors in this region could explain, in part, why NR2B-selective antagonists have analgesic effects (Chizh *et al.*, 2001 and see below).

At the subcellular level, NMDARs, including those containing NR2B, have been detected on synaptic, perisynaptic and extrasynaptic sites (Köhr, 2006). In most neurons, however, the density of NMDARs is higher in dendritic spines, within the postsynaptic density, than in the dendritic shaft and somatic membrane. At immature glutamatergic synapses, it is well established that NR2B-containing receptors predominate and mediate direct synaptic transmission. With maturation, the increase in NR2A expression usually results in faster decay kinetics and decreased sensitivity of synaptic currents to NR2B-selective antagonists. Moreover, several studies have shown that extrasynaptic NMDARs are enriched in NR2B subunits compared with synaptic receptors. These extrasynaptic NMDARs may be activated by spillover of glutamate released from multiple neighbouring synaptic sites (Scimemi *et al.*, 2004). However, in the adult brain, the segregation of NR2B and NR2A to extrasynaptic and synaptic sites is not absolute, and there are clear examples of adult synapses where NR2B subunits predominate (see for instance, Lopez de Armentia and Sah, 2003). The fact that at many adult synapses, NR2B subunits might incorporate preferentially into triheteromeric NR1/NR2A/NR2B receptors (Luo *et al.*, 1997), a receptor subtype shown only recently to have a low sensitivity to NR2B-selective antagonists (Hatton and Paoletti, 2005), is likely to explain why certain groups have proposed that NR2B is excluded from synaptic sites. Finally, there is accumulating evidence that NMDARs are also present at presynaptic sites where they can influence transmitter release. In particular, NR2B-containing autoreceptors have been described on primary sensory afferents of the spinal chord (Ma and Hargreaves, 2000), and at synapses on entorhinal cortical neurons (Woodhall *et al.*, 2001). Similarly to postsynaptic NMDARs, presynaptic NMDARs may also participate in certain forms of synaptic plasticity (Pinheiro and Mulle, 2008).

Allosteric inhibition by protons

Extracellular protons (H^+) are potent inhibitors of NMDARs. They inhibit NMDARs in a non-competitive and voltage-independent manner, indicating that they are not acting as channel blockers (Tang *et al.*, 1990; Traynelis and Cull-Candy, 1990; Vyklicky *et al.*, 1990). As a consequence of NMDAR inhibition by protons, mild extracellular acidosis accompanying ischaemia and seizures may minimize glutamate-induced neuronal damage (Giffard *et al.*, 1990; and see Dingledine *et al.*, 1999). Sensitivity of NMDARs to extracellular protons depends on subunit composition, with influence of both NR1 and NR2 subunits. Receptors containing the NR2C subunit are the least sensitive with an IC_{50} of ~pH 6.5 (Traynelis *et al.*, 1995; Low *et al.*, 2003). Receptors made of NR1a and NR2A have an intermediate pH sensitivity with an IC_{50} of ~pH 6.9 (when extracellular ambient zinc is chelated; Low *et al.*, 2000; 2003). NR1a/NR2B and NR1a/NR2D receptors display the highest pH sensitivity with an IC_{50} of ~pH 7.4 (Traynelis *et al.*, 1995). This implies that, under normal conditions, about half of NR1a/NR2B receptors are under tonic proton inhibition; it also suggests that small changes in extracellular pH can significantly alter the amount of current flowing through these receptors. Accordingly, endogenous alkaline transients fol-

lowing neuronal activity have recently been shown to boost postsynaptic NMDAR responses in hippocampal CA1 pyramidal neuron (Makani and Chesler, 2007). Proton sensitivity is also modulated by alternative splicing of the NR1 subunit. Inclusion of NR1 exon-5 (NR1b subunit) reduces proton sensitivity, an effect that has been attributed to the shielding of the proton sensor by positively charged residues present at the C-terminus end of exon-5 (Traynelis *et al.*, 1995; 1998). It is interesting to note that exon-5-containing NR1b/NR2A and NR1b/NR2B receptors have equal proton sensitivity, with IC_{50}s close to pH 6.7 (Traynelis *et al.*, 1995).

Although many residues, both on NR1 and NR2 subunits, have been shown to control proton inhibition (Traynelis *et al.*, 1998; Masuko *et al.*, 1999; Low *et al.*, 2000; 2003), the precise location of the proton 'sensor' (assuming that it forms a discrete site) remains unknown. Extensive mutagenesis has revealed that residues that influence proton sensitivity most strongly cluster in two neighbouring regions (Low *et al.*, 2003; but see Gielen *et al.*, 2008): (i) the lurcher region, composed of the 'SYTANLAAF' motif and located in the extracellular end of the second transmembrane segment (M2); and (ii) the linkers connecting the ABD S2 segment to the transmembrane segments (S2-M2 and S2-M3 linkers). These regions are closely associated with the activation gate of NMDARs (Chang and Kuo, 2008). The proton sensor is therefore likely to be tightly coupled to the movement of the NMDAR channel gate. Single-channel studies at NR1/NR2B receptors reveal that protons prolong one of the shut-time components, while it has almost no effect on channel open time (Banke *et al.*, 2005). These data strongly suggest that protons preferentially act by stabilizing a closed state rather than destabilizing the open state.

Modification of proton sensitivity appears to be a common downstream mechanism of a number of NMDARs' allosteric modulators. Thus, ifenprodil, exon-5 insert and polyamines at NR2B-containing receptors, and extracellular zinc at NR2A-containing receptors, all alter NMDAR function by shifting the pKa of the proton sensor (Traynelis *et al.*, 1995; Mott *et al.*, 1998; Choi and Lipton, 1999; Low *et al.*, 2000 and see below). These data reinforce the idea that the proton sensor and the channel gate are structurally and functionally integrated.

Modulators binding the interlobe cleft of the NR2B NTD

One important recent development in NMDAR function and pharmacology has been the discovery that the NTDs of NR2A and NR2B subunits form discrete modulatory domains binding non-competitive antagonists with strong subunit selectivity (Herin and Aizenman, 2004). So far, only the zinc ion has been identified as being a ligand of the NR2A-NTD (Choi and Lipton, 1999; Fayyazuddin *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2000; Paoletti *et al.*, 2000). Zinc binds the large interlobe crevice of the NTD and, by interacting with residues from both lobes 1 and 2, promotes its closure by a hinge bending mechanism, as seen in other clamshell-like domains (Paoletti *et al.*, 2000). Binding of zinc to the NR2A-NTD is responsible for the exquisite (nM) sensitivity of NR2A-containing receptors to extracellular zinc (IC_{50} ~ 15 nM for NR1/NR2A receptors; Chen *et al.*, 1997; Paoletti *et al.*, 1997; Choi and Lipton, 1999; Fayyazuddin *et al.*, 2000; Low *et al.*, 2000; Paoletti *et al.*, 2000; Hatton and Paoletti, 2005). The NTD of NR2B (but not that of NR2C and NR2D) also binds zinc, but with a much lower affinity. This modulatory site accounts for the low micromolar voltage-independent zinc inhibition of NR1/NR2B receptors (IC_{50} ~ 1 μM; Traynelis *et al.*, 1998; Rachline *et al.*, 2005). Thus, when applied at nanomolar concentrations (up to ~300 nM), zinc selectively inhibits receptors containing the NR2A subunit, a property than can be used to discriminate between NMDAR subtypes in physiological experiments (see Neyton and Paoletti, 2006). Moreover, because zinc is concentrated and released at many glutamatergic synapses in the CNS (Vogt *et al.*, 2000; Paoletti *et al.*, 2009), zinc is a potential candidate for an endogenous ligand of the NTDs of both NR2A and NR2B subunits. However, whether extracellular zinc acts as an *in vivo* regulator of NMDAR activity remains unknown.

Besides the zinc ion, the NR2B-NTD also binds ifenprodil [compound (1), Figure 2] and derivatives, a large family of synthetic organic compounds (Perin-Dureau *et al.*, 2002). Although first described as a cerebral vasodilator (Carron *et al.*, 1971), ifenprodil was later reported to have a neuroprotective action through non-competitive antagonism of NMDARs (Carter *et al.*, 1988). In 1993, Williams made the remarkable observation that ifenprodil displays strong (>100-fold) preference among the various NR1/NR2 receptor subtypes, by selectively inhibiting receptors containing the NR2B subunit (IC_{50} ~ 150 nM; Williams, 1993). Ever since this discovery, ifenprodil and derivatives have proven extremely useful as pharmacological tools to study the structure and function of NMDARs. They have also triggered intense pharmaceutical interest because of their therapeutic potential for a range of neurological and psychiatric disorders (see below).

Studies on chimeric NR2A/NR2B subunits and on isolated NTDs produced in bacteria mapped ifenprodil-binding site to NR2B-NTD (Gallagher *et al.*, 1996; Perin-Dureau *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2007; 2008; Han *et al.*, 2008). An extensive mutagenesis scan, combined with molecular modelling, further supported the hypothesis of ifenprodil binding in the large interlobe cleft of the NR2B-NTD (Perin-Dureau *et al.*, 2002). Functional studies also revealed that zinc and ifenprodil act in a mutually exclusive manner at NR2B-NTD, competing for putative binding sites that partially overlap (Rachline *et al.*, 2005). No model of zinc binding has been proposed yet, but the zinc ion is likely to interact with histidine 127, glutamate 47 and aspartate 265, all located in the NR2B-NTD interlobe cleft (Rachline *et al.*, 2005), and bearing side chains commonly found in zinc-binding sites (Alberts *et al.*, 1998). The first experimentally validated 3D model of ifenprodil docked in its binding pocket has recently been described (Mony *et al.*, 2009). In this model, ifenprodil occupies the NTD cleft, almost perpendicular to the plane of the hinge. The NTD cleft is in a closed conformation and ifenprodil directly interacts with residues both from lobes 1 and 2, lending support to a model in which ifenprodil binding promotes closure of the NR2B-NTD. The ifenprodil molecule adopts a conformation in which its benzyl group contacts hydrophobic residues at or near the NTD hinge, while its

phenol moiety makes hydrogen bonds with polar residues at the entrance of the cleft. The central piperidine moiety makes both Van der Waals interactions with F176 and ionic interactions with D101. The fact that this latter residue may also be directly involved in zinc coordination would explain why ifenprodil and zinc cannot occupy the NR2B-NTD cleft simultaneously (Rachline *et al.*, 2005).

Opposing an ifenprodil-binding site entirely formed by NTD-NR2B residues, some data in the literature suggest that determinants of ifenprodil binding may reside on the NR1 subunit. Thus, Masuko *et al.* (1999) found mutations in NR1-NTD lobe 1 that affect ifenprodil inhibition, while Han *et al.* (2008) showed that isolated NR1-NTDs, similarly to isolated NR2B-NTDs (but not NR2A-NTDs), bind radiolabelled ifenprodil. The NR1 residues highlighted by Masuko *et al.* (1999) are located at positions homologous to residues participating in hydrophobic dimerization interfaces in other receptors containing LIVBP-like domains. Rather than directly binding ifenprodil, these residues may therefore be involved in the transduction of the ifenprodil-induced conformational changes of NR2B-NTD (see Perin-Dureau *et al.*, 2002). Moreover, it is possible that such hydrophobic residues fortuitously bind ifenprodil when NR1-NTD is isolated in a polar solvent. In fully assembled NR1/NR2 receptors, this potential binding site is likely to be masked following NR1 and NR2 NTD dimerization.

Ifenprodil is the prototypical member of a large, and growing, family of NR2B-selective antagonists that can be usefully grouped as 'prodils'. Among them are synthesized analogues offering improved potency (at NR1/NR2B receptors) and selectivity versus additional 'off' target activities such as adrenergic and sigma receptors (Kew and Kemp, 1998; Chenard and Menniti, 1999; Nikam and Meltzer, 2002; Borza and Domany, 2006). The best characterized compounds and, consequently, those most commonly used as pharmacological tools are traxoprodil or CP-101,606 [Chenard *et al.*, 1995, (5)], besonprodil [CI-1041, (6), Chizh *et al.*, 2001] and Ro 25-6981 [Fischer *et al.*, 1997, (7)], all of which are ~10-fold more potent than ifenprodil; the recently disclosed RGH-896 or radiprodil (8) can also be considered to form part of this chemical group (Figure 3A). These 'second generation' compounds, which share the same structural features as ifenprodil, are likely to bind in a similar mode to the NR2B-NTD (see Malherbe *et al.*, 2003 for Ro 25-6981). Large-scale screening approaches and medicinal chemistry efforts have also led to the identification of further novel NR2B-selective antagonists such as MK-0657 (9) (Figure 3B) and EVT-101 (structure not disclosed). These agents, like radiprodil, have good potency at NR2B-containing receptors and enhanced oral bioavailability compared with earlier agents, and have been progressed into the clinic by Merck, Evotec and Gedeon Richter/Forest Laboratories respectively (see Table 1). Recently, a more diverse array of structures have been described as NR2B antagonists including (Figure 3B) indole- and benzimidazole-2-carboxamides [Borza *et al et al.*, 2006; 2007, (10)], 2-(3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2yl)-pyridines [Büttelmann *et al.*, 2003, (11)], benzamidines [Claiborne *et al.*, 2003, (12)], N-(phenylalkyl)cinnamides [Tamiz *et al.*, 1999, (13)], N1-(benzyl)cinnamamidines [Curtis *et al.*, 2003; Kiss *et al.*, 2005, (14)], 1-Benzyloxy-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl-amines [Alanine *et al.*, 2003, (15)], Taisho's HON0001 [Suetake-Koga *et al.*, 2006, (16)] and di-imidazoles (17). Many of these structurally distinct compounds are highly potent, with low nanomolar affinities at NR1/NR2B. However, whether these latest generation NR2B-selective antagonists have a similar binding mode to ifenprodil remains to be determined. The recently proposed 3D model of ifenprodil-binding site into NR2B-NTD (Mony *et al.*, 2009) provides a useful approach to tackle this question.

The transduction cascade that couples binding of the modulatory NTD ligand to receptor inhibition (i.e. channel gate closure) has been recently dissected in the case of the high-affinity zinc inhibition of NR1/NR2A receptors (Gielen *et al.*, 2008, and see Figure 4B). First, zinc binds the interlobe cleft of the NR2A-NTD and promotes its closure. This closure then exerts tension on the linkers connecting the NTDs to the ABDs, an effect that triggers disruption of the ABD dimer interface; this in turn relieves the strain on the transmembrane segments, and together with proton binding, allows closure of the channel gate. This mechanism shows common features with that underlying fast desensitization of AMPA and kainate receptors, where conformational rearrangements at the ABD dimer interface also occur (Sun *et al.*, 2002). The inhibition of NR2B-containing receptors following zinc or ifenprodil binding to the NR2B-NTD may proceed through a similar mechanism to that described for zinc on NR1/NR2A receptors. The fact that ifenprodil inhibition of NR1/NR2B receptors reflects an enhancement of tonic proton inhibition (Pahk and Williams, 1997; Mott *et al.*, 1998), similarly to zinc inhibition of NR1/NR2A receptors (Choi and Lipton, 1999; Low *et al.*, 2000), argues in this direction. However, zinc inhibition of NR1/NR2B receptors appears not to depend on pH (Traynelis *et al.*, 1998; Low *et al.*, 2000), suggesting that zinc binding to NR2B-NTD may inhibit NR1/NR2B receptors through a different mechanism.

Polyamines: NR2B-selective positive allosteric modulators

Polyamines are polybasic aliphatic amines that are positively charged at physiological pH. The endogenous polyamines, spermine [(3), Figure 2], spermidine and putrescine, are synthesized from ornithine, a by-product of the urea cycle. Polyamines are widely distributed throughout the body and are found at high intracellular levels, where they interact with nucleic acids and proteins, including plasma membrane ion channels. In the CNS, there is also evidence that, under certain conditions, polyamines may be present in the extracellular medium, where they would act as modulators of neuronal excitability. First, polyamines are released in a Ca^{2+}-dependent manner following neuronal stimulation; second, high-affinity uptake systems for polyamines exist; and third, extracellular polyamines interact with various ion channels and receptors, including calcium channels and NMDARs (Rock and Macdonald, 1995).

Extracellular polyamines have multiple effects on NMDAR responses (Rock and Macdonald, 1995). Early patch-clamp

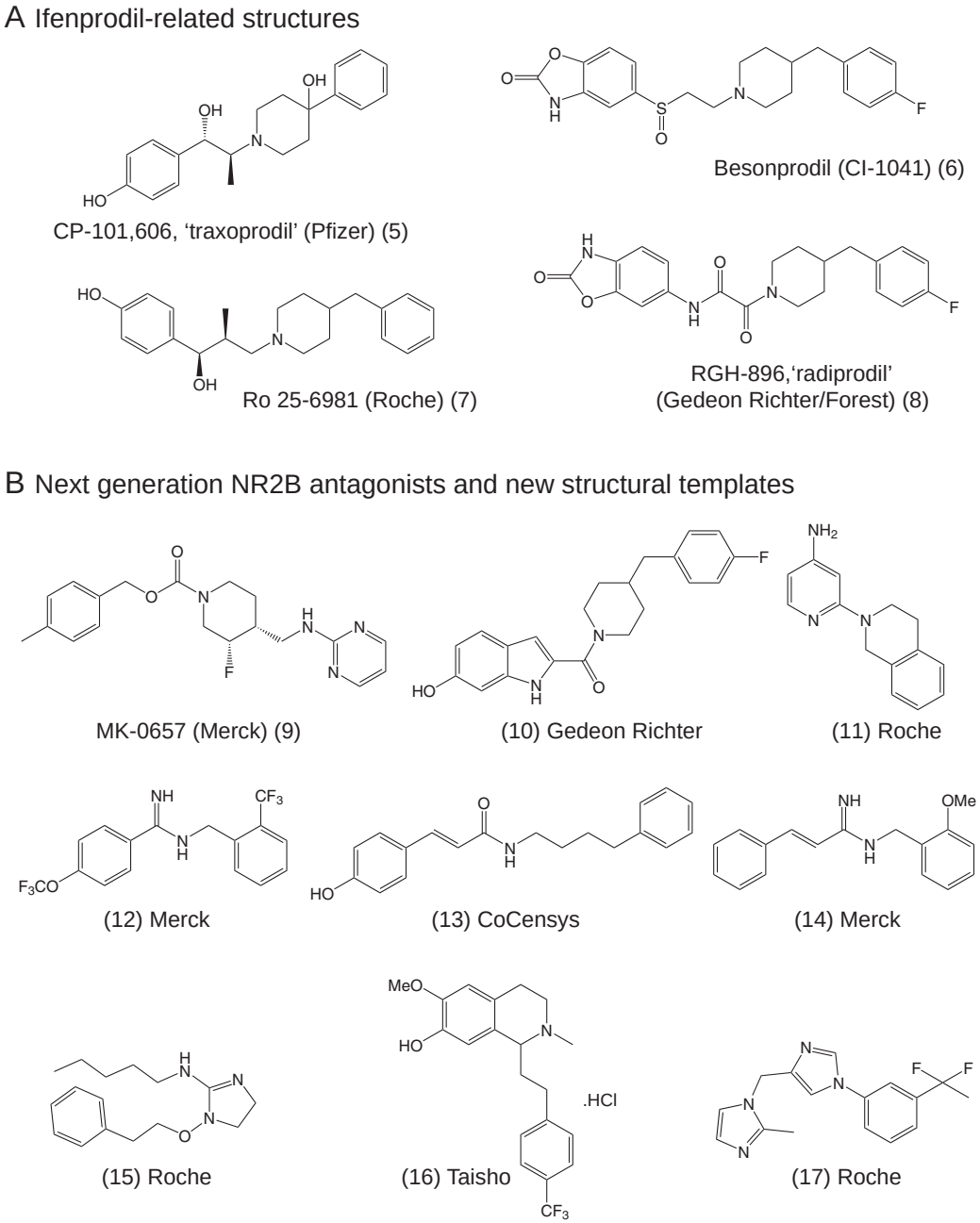


Figure 3 Structure of NR2B-selective NMDAR antagonists. (A) 'Second generation' compounds closely related in structure to the prototypical NR2B antagonist ifenprodil. (B) The latest generation of NR2B-selective antagonists and new structural templates. This represents a current perspective based on publications, patents, company press releases and analyst information; literature references, where available, are cited in the text. NMDAR, N-methyl-D-aspartate receptors.

studies on native NMDARs from cultured hippocampal neurons showed highly variable effects of polyamines, ranging from a strong enhancement to a marked inhibition depending upon the particular cell examined (Benveniste and Mayer, 1993). It is now well established that this variability can be accounted for different levels of expression of NMDAR subpopulations in individual cell, together with differential effects of polyamines depending on receptor subunit composition.

Spermine (and spermidine) produces three different effects on NMDARs: a voltage-dependent block, a glycine-dependent potentiation and a voltage-independent and glycine-independent potentiation. The voltage-dependent block is due to spermine entering the pore and occluding ion fluxes, much like the block produced by extracellular Mg^{2+} (Rock and MacDonald, 1992). It is highly voltage-dependent with IC_{50} values of 350 μM at −60 mV and 27 mM at 0 mV (NMDAR responses from cultures hippocampal neurons; Benveniste and Mayer, 1993). In contrast to Mg^{2+}, at very hyperpolarized potentials, polyamines may escape their blocking site by permeating the NMDAR channel (Araneda *et al.*, 1999). The polyamine block has the same subunit dependence as the

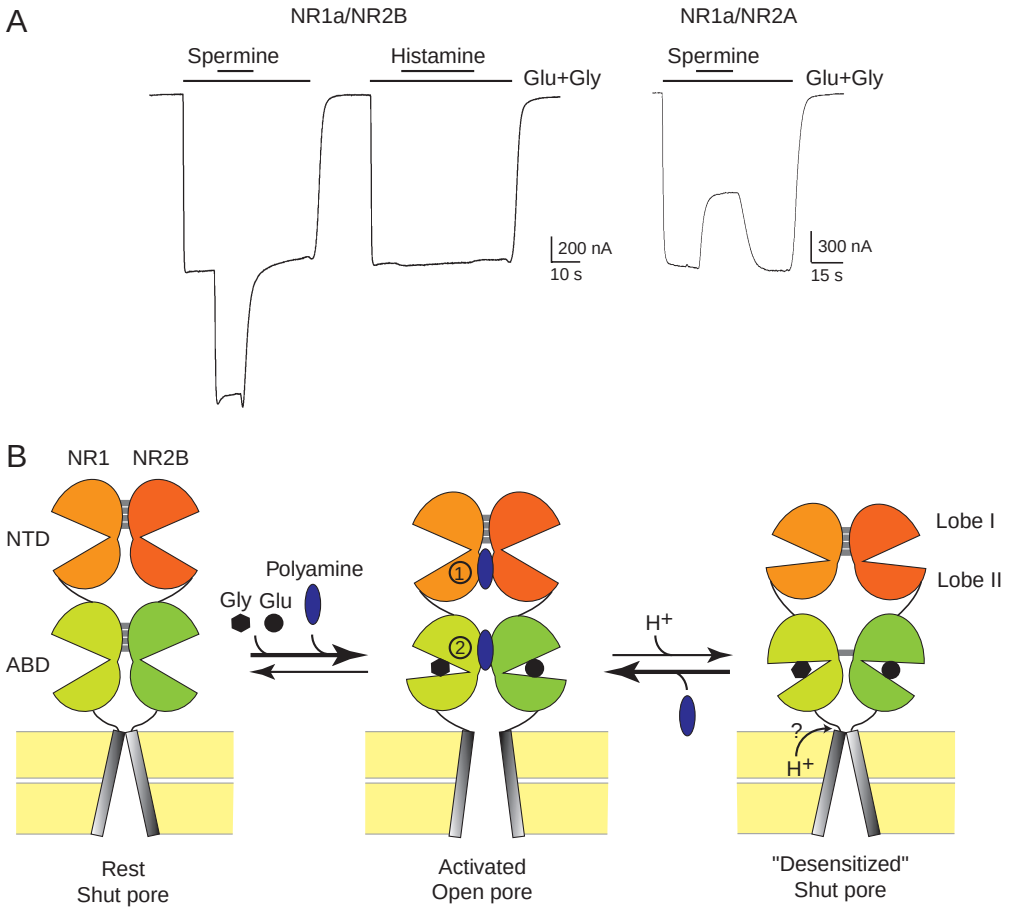


Figure 4 Spermine, but not histamine, potentiates NR1a/NR2B receptors. (A) Typical current traces obtained from oocytes expressing the NR1-1a subunit (NR1a) with the NR2B (left panel) or the NR2A (right panel) subunit. Spermine was applied at a concentration of 200 μM and histamine at 100 μM, each during an application of agonists (100 μM glutamate and glycine, saturating concentrations). Holding potential −40 mV (left panel) and −30 mV (right panel). The bars above the current traces indicate the duration of agonist, spermine and histamine applications. Note that application of 100 μM histamine has no effect on NR1a/NR2B receptors while spermine does (same cell). Note also that spermine potentiation is absent on NR1a/NR2A receptors. (B) Two hypothetical mechanisms of how a polyamine could potentiate NR2B-containing receptors. These models are based on the mechanism proposed for allosteric inhibition of NR1/NR2A receptors (Gielen *et al.*, 2008). While the full receptor is a tetramer, only a NR1/NR2B heterodimer is shown. It is hypothesized that NTDs dimerize, and that closures of the NTDs can inactivate the receptors (i.e. induce channel gate closure) by pulling apart the ABD dimer interface ('desensitized' state). Mechanism (1): the polyamine molecule binds between the NR1 and NR2 NTD lobes II, making NTD closure, and ABD dimer interface disruption, more difficult. Mechanism (2): the polyamine molecule directly binds and stabilizes the ABD dimer interface. Entry into the 'desensitized' state is thus disfavoured. This mechanism resembles that described for cyclothiazide-induced suppression of desensitization at AMPA receptors (Sun *et al.*, 2002; Mayer, 2006). In both models, proton binding, which stabilizes a closed state of the channel (Banke *et al.*, 2005), is proposed to be closely associated with ABD dimer interface breaking (Gielen *et al.*, 2008). ABD, agonist-binding domain; AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate; Glu, glutamate; Gly, glycine; NTD, N-terminal domain.

Mg^{2+} block, being less pronounced for NR2C-containing and NR2D-containing receptors than for NR2A-containing or NR2B-containing receptors (these latter two having the same degree of blockade; Williams *et al.*, 1994). Finally, mutations in the pore at the critical asparagines residues (Q/R/N site) that suppress Mg^{2+} block also suppress spermine block, indicating a shared binding site deep in the pore (Kashiwagi *et al.*, 1997; Traynelis *et al.*, 1998).

Polyamines can enhance NMDAR responses by increasing the apparent sensitivity for glycine (glycine-dependent potentiation). This is reflected by the fact that at low glycine concentrations, polyamines stimulate NMDAR responses to a greater extent than at saturating glycine concentrations (McGurk *et al.*, 1990). In the presence of 1 mM spermine, the apparent affinity for glycine increases by ~3-fold, an effect largely due to a decrease in the rate of glycine dissociation from its binding site on NR1 (Benveniste and Mayer, 1993). Glycine-dependent potentiation occurs both at NR2A-containing and NR2B-containing receptors but not at NR2C-containing and NR2D-containing receptors (Zhang *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1995). Moreover, in contrast to the voltage-independent and glycine-independent potentiation (see below), the glycine-dependent stimulation is not influenced by the type of NR1 subunit splice variants. The polyamine-binding site mediating the glycine-dependent potentiation is unknown, but may reside on the NR1 subunit that harbours the glycine-binding site. In physiological conditions, it is likely that this site is partially occupied by endogenous Ca^{2+} and/or Mg^{2+} because both cations also increase glycine sensitivity when present at

Table 1 NR2B-selective compounds in clinical development

NR2B antagonist (route of administration)	*Most advanced phase of development (indication)*	Pharmacological activity *(in vitro)*	*Activity in preclinical species (in vivo relevant model)*	*Recent clinical data*	*References*
CP-101,606 Traxoprodil (i.v.)	Phase 2 (experimental medicine studies in pain, Parkinson's and major depression recently completed. Previously discontinued for stroke/ traumatic brain injury)	Potent and selective NR2B antagonist: NR2B IC_{50} = 8–13† to 60* nM NR2A IC_{50} = 10 μM† (selectivity > 1000-fold)	Efficacious in rat models of acute inflammatory pain, for example, carageenan (ED_{50} = 37 mg·kg^{-1}) neuropathic pain (ED_{50} = 4.1 mg·kg^{-1}) and visceral pain (mustard oil, MED 10 mg·kg^{-1}). Also neuroprotective in models of stroke (middle cerebral artery occlusion) and efficacious in rodent models of Parkinson's disease.	Phase 2 experimental medicine study in 19 patients with chronic pain (spinal cord injury, radiculopathy) indicated significant reduction in pain score following a controlled i.v. infusion of CP-101,606 to 100 ng·mL^{-1}. CP-101,606 was reasonably well tolerated, although some CNS AEs such as dizziness, depression and hypoaesthesia were reported. A phase 2 trial in Parkinson's disease (up to 200 ng·mL^{-1}) has also been completed. Some improvement in levodopa-induced dyskinesias but no significant effect on Parkinsonism. AEs included abnormal thinking, dissociation and amnesia. Recent data demonstrate efficacy of CP-101,606 in treatment of refractory major depressive disorder.	http://www.pfizer.com Trube *et al.* (1996) Boyce *et al.* (1999; 2002) Chenard and Menniti (1999) Sang *et al.* (2003) Nutt *et al.* (2008) Preskorn *et al.* (2008)
RGH-896 Radiprodil (p.o.)	Phase 2. (neuropathic pain and CNS indications)	Potent and selective NR2B antagonist: NR2B IC_{50} = 3–10 nM†* NR2A IC_{50} > 10 μM† (selectivity > 1000-fold)	Efficacious in rat models of acute inflammatory pain, for example, FCA (anti-allodynic effects at 0.25 and 4 mg·kg^{-1}) and neuropathic pain (MED = 5 mg·kg^{-1}).	Phase 1 completed successfully. Phase 2 studies in neuropathic pain stated as planned as early as 2006 (co. press release), however, no further public details are available on the progression of this molecule.	http://www.richter.hu http://www.frx.com/ Farkas *et al.* (2003) Horvath (2004)
MK-0657 (compound 33) (p.o.)	Phase 2 (neuropathic pain, Parkinson's disease, major depression)	Potent and selective NR2B antagonist: NR2B IC_{50} = 3 nM‡ (Selectivity data not disclosed.)	Efficacious in rat carageenan model of acute inflammatory pain, ED_{50} = 3 mg·kg^{-1} No further details have been disclosed.	Stated as approved for clinical development and ready to enter phase 1 clinical trials (co. press release). Subsequently, a phase 1 trial in 18 Parkinson's disease patients with 7 mg MK-0657 + levodopa was completed in 2008, and a study within major depression is underway, 4–8 mg·day^{-1} (see www.clinicaltrials.gov). No further details have been disclosed.	http://www.merck.com McCauley (2007) McCauley *et al.* (2008)
EVT-101 (p.o.)	Phase 1 (pain and Alzheimer's disease)	Potent and selective NR2B antagonist: NR2B IC_{50} = 2 nM†* NR2A/C/D IC_{50} > 10 μM† (Selectivity > 1000-fold)	Protection against NMDA-induced seizures ED_{50} = 4.6 mg·kg^{-1} No further details have been disclosed.	Phase 1 single (up to 15 mg) and multiple (up to 8 mg) dose studies complete in a total of 90 patients. No AEs reported. T1/2 defined as 11 h. Further phase 1b studies incorporating fMRI studies demonstrated CNS effects of EVT-101. Phase 2 efficacy studies in third molar extraction (dental pain) and spinal cord injury (neuropathic pain) are planned (co. press release).	http://www.evotec.com/

The table summarizes the currently available public data on NR2B-selective compounds that are being evaluated in the clinic assembled from company press releases, analyst presentations, clinical trials register (http://www.clinicaltrials.gov/) and the publications cited. Chemical structures of the NR2B antagonists listed, where available, are given in Figure 3; note that there are no known positive modulator compounds currently in clinical development.

*Determination by electrophysiology (whole-cell patch clamp or oocyte recording).

†[3H]-Ro256981 or [3H]-MK801 binding assay.

‡FLIPR-Ca2+ assay.

AE, adverse event; CNS, central nervous system; ED_{50}, effective dose exhibiting 50% reversal; FCA, Freund's complete adjuvant; FLIPR, fluorescent imaging plate reader; fMRI, functional magnetic resonance imaging; IC_{50}, effective concentration exhibiting 50% inhibition; MED, minimum effective dose; NMDA, N-methyD-aspartate.

mM concentrations (Wang and MacDonald, 1995; see Paoletti *et al*., 1995).

The third effect of polyamines on NMDARs is a potentiation, which is both voltage-independent and glycine-independent because it can be observed both at negative and positive membrane potentials and with saturating glycine concentrations (McGurk *et al*., 1990; Lerma, 1992; Benveniste and Mayer, 1993; Lu *et al*., 1998; Figure 4A). With spermine, the EC_{50} for this effect is ~150 μM and results in a maximal potentiation around threefold (at pH 7.3; Benveniste and Mayer, 1993). Remarkably, the voltage-independent and glycine-independent polyamine potentiation is observed exclusively at receptors that incorporate the NR2B subunit (Williams, 1994a; Williams *et al*., 1994; Zhang *et al*., 1994; Traynelis *et al*., 1995; Figure 4A). Studies on recombinant NR1/NR2B receptors have revealed that the NR2B-specific polyamine potentiation arises from the relief of tonic proton inhibition. Thus, at physiological pH, polyamines enhance NR1/NR2B responses by shifting the pKa value of the proton sensor towards more acidic values (Traynelis *et al*., 1995). Accordingly, at NR1/NR2B receptors, there is a strong correlation between the proton sensitivity and the degree of polyamine potentiation (Traynelis *et al*., 1995; 1998).

Many mutations that affect the NR2B-specific polyamine potentiation have been described. These mutations, usually of acidic residues, are found both on NR1 and NR2 subunits and are scattered throughout the extracellular region. Most of these mutations (if not all) also modify proton sensitivity (Traynelis *et al*., 1995; Williams *et al*., 1995; Kashiwagi *et al*., 1996; Masuko *et al*., 1999). In consequence, it is still unclear whether these mutations alter polyamine potentiation directly, by disrupting the polyamine-binding pocket, or indirectly, by changing the proton sensitivity. Based on our recent finding that proton inhibition of NMDARs involves disruption of the ABD dimer interface (Gielen *et al*., 2008), we propose two mechanisms by which polyamines could relieve tonic proton inhibition and thus enhance activity of NR2B-containing receptors (Figure 4B). In a first model, the polyamine molecule would act similarly than cyclothiazide on AMPA receptors (Sun *et al*., 2002): it would bind at the ABD dimer interface and stabilize the dimer assembly. By doing so, it would decrease pH sensitivity by rendering ABD dimer disruption more difficult (an effect that would also account for the spermine-induced acceleration of NMDAR current deactivation; Rumbaugh *et al*. 2000). In a second model, the polyamine would bind at the level of the NTDs, between the two 'bottom' lobes of a NTD pair. By 'gluing' together these lobes, the polyamine would render NTD closure less favourable, an effect that in turn would tend to stabilize the ABD dimer interface (and thus decrease proton sensitivity; Gielen *et al*., 2008). In agreement with this mechanistic scheme, 3D homology modelling of a NR1/NR2B NTD pair indicates that many of the acidic residues of NR1 and NR2B known to control glycine-independent spermine potentiation locate on the side of the NTD 'bottom' lobes, with residues of NR2B facing those of NR1. This suggests a polyamine-binding site at the boundary between the two NTD 'bottom' lobes (Huggins and Grant, 2005). The absence of some of these acidic residues in the NTDs of the other NR2 subunits could explain why the glycine-independent potentiation by polyamines requires the NR2B subunit. A model in which the polyamine molecule binds the NR1/NR2B NTD interface and holds the NTDs open, while ifenprodil binds in the NR2B-NTD cleft and promotes its closure, is fully consistent with the proposal of Kew and Kemp (1998) that spermine and ifenprodil bind distinct sites that interact in a negative allosteric manner (with binding of spermine promoting ifenprodil dissociation and vice versa; see also Han *et al*., 2008).

The neurotransmitter histamine has been proposed to act as an endogenous activator of the NR2B-specific polyamine modulatory site (Williams, 1994b). However, results from our lab (Figure 4A) and that of Steven Traynelis (pers. comm.) show a lack of effect of histamine on responses mediated by NR1a/NR2B receptors. The reason for this discrepancy remains unclear. Finally, Mg^{2+}, but not Ca^{2+}, mimics the glycine-independent potentiating effect of polyamine at NR2B-containing receptors (Paoletti *et al*., 1995; Kew and Kemp, 1998). With an Mg^{2+} EC_{50} of ~2.0 mM close to physiological concentration of extracellular Mg^{2+}, the NR2B-specific polyamine potentiating site is likely to be partially occupied by the magnesium ion under physiological conditions.

Negative and positive allosteric modulation by neurosteroids

Most steroids act like hormones being synthesized by glandular tissues and released into the general circulation system. Steroids diffuse through membranes and bind intracellular receptors, which in turn interact with transcription factors to enhance or suppress gene expression. Because of the necessity for activation of the transcriptional and translational machineries, the physiological responses induced by steroids usually take hours to days. Steroids synthesized in the periphery can cross the blood–brain barrier and produce changes in mood and behaviour (Belelli and Lambert, 2005). The brain is also capable of synthesizing steroids *de novo* (Robel and Baulieu, 1994). Neurosteroids are normally present at nanomolar concentrations in the CNS, but their levels can increase significantly following stress, for instance. In contrast to the classical genomic effects of steroids, endogenous neurosteroids act locally and produce acute effects on neuronal excitability, with time delays ranging from seconds to minutes, suggesting direct modulatory effects on membrane proteins. It is now well established that gamma-amino butyric acid-A (GABA-A) receptors, which mediate most of the inhibitory transmission in the CNS, are major targets of neurosteroids (Belelli and Lambert, 2005). Neurosteroids also regulate NMDARs. At these receptors, neurosteroids exert either positive or negative effects depending both on the neurosteroid chemistry and the receptor subunit composition.

Pregnenolone sulfate [PS (4), Figure 2], one of the most abundant neurosteroids and a negative modulator of GABA-A receptors, was initially shown to potentiate native NMDARs but not AMPA and kainate receptors (Wu *et al*., 1991; Bowlby, 1993). PS is a derivative of pregnenolone, which is formed by cleavage of cholesterol side chain in glial cells. Potentiation of NMDAR responses by PS is voltage independent, does not

affect single-channel conductance and occurs only at relatively high concentrations of PS (>1 μM). Interestingly, when applied in the extracellular medium, PS increases NMDAR activity recorded not only from excised outside-out patches but also from cell-attached patches, indicating that the lipophilic PS may penetrate the cell membrane and reach NMDAR channels by diffusion (Bowlby, 1993). PS differentially modulates activity of recombinant NR1/NR2 NMDARs. It potentiates NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors (with EC_{50} in the 10–30 μM range) while it inhibits, in a non-competitive manner, NR1/NR2C and NR1/NR2D receptors (with IC_{50} in the 100–200 μM range; Malayev *et al.*, 2002; Horak *et al.*, 2006). The mechanism of action of PS at NR1/NR2B receptors has been studied using fast perfusion techniques on transfected human embryonic kidney (HEK)-293 cells. Strikingly, the degree of PS potentiation is an order-of-magnitude larger when PS is applied just before than during NMDAR activation, indicating that the PS affinity is strongly decreased after glutamate binding (Horak *et al.*, 2004).

PS enhances NMDAR responses by acting at a site that likely differs from the site(s) responsible for spermine potentation (Park-Chung *et al.*, 1997). By constructing chimeric NR2B/NR2D (Jang *et al.*, 2004) or NR2A/NR2C (Horak *et al.*, 2006) subunits, the PS potentiating site has been recently mapped to a region encompassing the M2–M3 extracellular loop and the M3 transmembrane segment. In the NR2 M2–M3 loop, helices J and K appear to be important for PS sensitivity (Jang *et al.*, 2004). Because helix J is a key constituent of the dimer interface between neighbouring NR1-NR2 ABDs, Jang *et al.* (2004) have proposed that PS binds and stabilizes this interface very much like the positive allosteric modulator cyclothiazide on AMPA receptors. There are, however, experimental data that are difficult to reconcile with a PS-binding site at the ABD dimer interface. First, PS potentiation appears to be functionally independent from proton inhibition (Jang *et al.*, 2004), whereas stability of the ABD dimer is closely correlated to proton sensitivity (Gielen *et al.*, 2008). Second, the transmembrane segment M3 appears critical for the potentiating effect of PS, suggesting that this region may contain residues directly binding PS (Jang *et al.*, 2004). Thus, the potentiating effect of PS on NMDARs may be mediated by a site in the membrane region rather than at an extracellular location. The lipophilic nature of PS and the very slow kinetics of its action at NR1/N2B receptors (Horak *et al.*, 2004) are compatible with this hypothesis. It is interesting to note that at GABA-A receptors, transmembrane sites are responsible for the regulatory effects of neurosteroids on these receptors (Hosie *et al.*, 2006).

The PS analogue 3α-hydroxy-5β-pregnan-20-one sulphate [3α5βS (2), Figure 2] is another endogenous neurosteroid that modulates NMDAR activity. 3α5βS inhibits native and recombinant NMDARs, with little selectivity among the different NR1/NR2 receptor subtypes. It acts in a voltage-independent and non-competitive manner, strongly arguing for a binding site outside the pore and the agonist-binding pockets (Park-chung *et al.*, 1994; Park-Chung *et al.*, 1997; Malayev *et al.*, 2002; Petrovic *et al.*, 2005). Thus, despite strong chemical similarity, PS and 3α5βS produce opposite effects at NR1/NR2A and NR1/NR2B receptors, the former acting as a positive allosteric modulator and the latter as a negative allosteric modulator. Structure-activity studies on the steroid molecules have led to the identification of important structural features that determine the action of neurosteroids at NMDARs. The presence of a negative charge (bulky or not) at the C3 position seems mandatory for both the potentiating and inhibitory effects of neurosteroids on NMDARs (Park-Chung *et al.*, 1997; Weaver *et al.*, 2000). Moreover, the geometry of the neurosteroid strongly influences the sign of the modulatory effect. Neurosteroids having a bent geometry (3α5βS and 3β5βS) inhibit native NMDAR responses (mostly from NR2A-containing and/or NR2B-containing receptors), whereas those having a more planar configuration (PS and 3β5αS) potentiate such responses (Weaver *et al.*, 2000). Thus, whether a neurosteroid enhances or decreases NMDAR activity critically depends on the geometry of its A–B ring junction, a parameter that is determined by the stereochemistry of the C5 position.

NR2B-containing receptor function and the therapeutic potential of subtype-selective NMDAR modulation

There is currently great interest in determining whether different NMDAR subtypes make specific contributions to physiological and pathological neuronal processes. Dissection of the roles of NMDAR subtypes can be performed using genetic (genetically modified mice, RNAi-mediated gene interference) or pharmacological tools. All of these approaches have recognized limitations (e.g. see Neyton and Paoletti, 2006 for the pharmacological approach) and, hence, despite intense investigation, there are many controversial issues in the field. Several parameters may strongly influence the role that a NMDAR subtype may play: (i) its particular receptor subunit composition, which determines the level of receptor activity and kinetic behaviour; (ii) its subcellular location (synaptic or extrasynaptic); (iii) its coupling to downstream signalling cascades (these latter two parameters being likely dependent on the subunit composition); and (iv) potential changes in its expression or activity linked to disease.

Based on our current understanding of the roles of the different NMDAR subtypes in normal physiology and in pathophysiological conditions, it appears that subtype-selective modulation of receptor function offers emerging therapeutic potential for the treatment of a range of CNS disorders. Thus, NR2B-selective antagonists may offer utility for the treatment of disorders including chronic pain, Parkinson's disease, Huntington's disease, Alzheimer's disease, cerebral ischaemia and major depression.

Notably, while non-selective NMDAR antagonists commonly exhibit a range of side effects including behavioural, cardiovascular and potentially cytotoxic activities, which have limited their therapeutic development, NR2B-selective antagonists are relatively well tolerated (Kemp *et al.*, 1999; Chazot, 2004; Gogas, 2006). In addition to the inherent sparing of non-NR2B-containing receptor function as a consequence of subtype selectivity, including a relative lack of effect in brain regions with little or no NR2B expression, such as the cerebellum, ifenprodil and related compounds also display an activity-dependent mode of action; they bind with a higher affinity to the activated and desensitized states of the

receptor than to the unliganded resting state (Kew *et al*., 1996; Fischer *et al*., 1997; Gill *et al*., 2002). Thus, these compounds preferentially block NMDARs continuously or repetitively activated, as may be the case in pathological conditions, while leaving those that are physiologically activated relatively unaffected. In addition, as ifenprodil inhibition of the NR2B-containing receptors is mediated through an enhancement of proton inhibition (Pahk and Williams, 1997; Mott *et al*., 1998), antagonist efficacy would be further increased under pathological conditions where pH levels also fall, such as in ischaemia (Silver *et al*., 1992). Thus, both the mechanism of action and subunit selectivity contribute to the relative lack of adverse events/good tolerability profile associated with this compound class (Kemp *et al*., 1999; Gogas, 2006).

Although most studies point towards an improved therapeutic index with the NR2B-subtype-selective approach, recent studies have raised concerns regarding the role of NR2B in mediating phencyclidine (PCP)-like behavioural effects and the potential for abuse liability as previously associated with pan-NMDAR antagonists, such as ketamine. Preclinical studies with Ro 25-6981 (Chaperon *et al*., 2003) and CP-101,606 (Nicholson *et al*., 2007) suggest a role of NR2B in producing the subjective and reinforcing effects associated with PCP in rodents and primates. Although noted to be generally well tolerated in the clinic, some indications of such activity have emerged in recent clinical studies with CP-101,606 (Table 1). Further work is, therefore, required to explore these aspects in more detail, especially for the latest NR2B-selective antagonists progressed into the clinic, to determine if an acceptable balance between efficacy and side effects exists to support their further development for the treatment of the range of disorders outlined below.

Therapeutic potential of NR2B-selective antagonists

Pain

Clinically, broad-spectrum NMDAR antagonists (e.g. ketamine, dextromethorphan) are reportedly used off label for the treatment of neuropathic pain (Chizh *et al*., 2001; 2007); they have good efficacy, but suffer from a generally unacceptable side-effect profile due to a very narrow therapeutic index. The rationale for developing subtype-selective NMDAR antagonists therefore stems from a desire to maintain NMDAR- mediated efficacy while moving away from the side effects resulting from indiscriminate broad NMDAR blockade. Initial focus on NR2B derived from the more localized expression of NR2B in the dorsal horn of the spinal cord as well as in higher brain centres thought to be important for the relay and conscious perception of pain, for example, the thalamus and anterior cingulate cortex (Figure 1). The availability of the 'prodil' class of NR2B-selective antagonists (Figure 3) has led to rapid progress in validating NR2B-containing NMDARs as a target for the treatment of pain, with many studies reporting efficacy of such agents in models of acute (Taniguchi *et al*., 1997; Boyce *et al*., 1999) and chronic inflammatory (Wilson *et al*., 2006), neuropathic (Boyce *et al*., 1999) and even visceral pain (Boyce *et al*., 2002) at doses that are devoid of overt behavioural side effects. More recent research has also defined a key involvement of NR2B-containing receptors in mechanisms, such as 'wind up' and 'central sensitization', that operate spinally and supraspinally, and which may explain the apparent broad-spectrum activity of NR2B antagonists across the various disease models. These pharmacological studies have been complemented by additional insight into the role of NR2B-containing receptors in pain gained from studies with transgenic mice overexpressing NR2B in the forebrain which display a selective enhancement of persistent pain and allodynia (Wei *et al*., 2001). Similarly, intrathecal administration of siRNAs against the NR2B subunit reduces the pain responses induced by peripheral inflammation (Tan *et al*., 2005).

The potential of NR2B antagonists for the treatment of pain has now gained clinical precedence based on the observed efficacy of CP-101,606 in a placebo-controlled crossover phase 2a study in spinal cord injury and monoradiculopathy patients, where a significant reduction in pain score was seen following i.v. dosing of CP-101,606 (Sang *et al*., 2003). CP-101,606 was reasonably well tolerated in this study but did yield some CNS side effects (Table 1). Despite these encouraging data, subsequent progress in this field has been hampered by the lack of compounds with good orally bioavailability, appropriate selectivity versus human ether-a-gogo related gene (hERG), and concerns regarding CNS side effects and abuse potential as discussed above. Despite these challenges, Gedeon Richter and Forest Laboratories, Merck and Evotec have now identified orally bioavailable agents that have progressed into clinical development (Table 1). To date, only limited information concerning the safety profile of these agents in phase 1 trials is available, and this provides some basis for optimism (Table 1). However, it will only be with efficacy data from appropriate phase 2 studies that these initial findings can be put into context of therapeutic index and the prospects for further development fully evaluated.

Parkinson's disease

The degeneration of nigral dopaminergic neurons and the depletion of dopamine from the nigro-striatal pathway results in overactivation of glutamatergic projections to the striatum and basal ganglia output nuclei. In addition, NMDARs have been proposed to play a role in the development of levodopa-induced dyskinesias. Accordingly, the therapeutic potential of NMDAR antagonists has been investigated, and broad-spectrum antagonists have been shown to exhibit antiparkinsonian or antidyskinetic activity in rodent and monkey models, and the low affinity NMDAR antagonist amantadine has been shown to exhibit antidyskinetic activity in humans (Del Dotto *et al*., 2001). Subsequently, NR2B-selective antagonists have been shown to exhibit efficacy in preclinical models of Parkinsonism in both rodents and non-human primates (e.g. Steece-Collier *et al*., 2000; Loschmann *et al*., 2004; Wessell *et al*., 2004), with an apparently improved tolerability profile relative to broad-spectrum antagonists. While ifenprodil failed to show a significant benefit in a small clinical trial in Parkinson's disease patients as adjunct therapy to L-DOPA (Montastruc *et al*., 1992), in a recent study, CP-101,606 exhibited antidyskinetic but not antiparkinso-

nian effects, although at doses associated with dissociation and amnesia (Nutt *et al*., 2008). Further studies are required to determine whether therapeutic efficacy can be achieved at lower doses, in the absence of adverse cognitive effects. A phase 1 study with MK-0657 as adjunct therapy to levodopa has also been reported as completed, although data have not yet been disclosed (Table 1).

Huntington's disease

Huntington's disease is an autosomal dominant inherited disease characterized by selective neuronal degeneration, most prominently of striatal GABAergic medium-sized spiny neurons. The disorder results from expression of mutant forms of the *huntingtin* gene, which contain an expanded trinucleotide CAG repeat sequence encoding an extended polyglutamate tract in the translated protein. Studies of animal and cellular models expressing mutant forms of the huntingtin protein have implicated NMDAR dysregulation and subsequent excitotoxic damage in the pathophysiology of the disease. For example, in a mouse model of Huntington's disease, striatal GABAergic medium-sized neurons show a selective enhancement of NMDAR currents mediated by NR2B-containing receptors (Zeron *et al*., 2002) and this increase may underlie the selective neuronal loss in Huntington's disease (Li *et al*., 2003). Thus, early intervention with selective NR2B antagonists at the onset of pathology, or presymptomatically, may offer therapeutic potential in this disorder.

Alzheimer's disease

The low affinity, broad-spectrum NMDAR channel blocker memantine has been approved in both the USA and Europe for the treatment of moderate to severe Alzheimer's disease. As NMDAR activity is well recognized to play a critical role in learning and memory, the efficacy of memantine as a symptomatic, cognitive-enhancing therapy in Alzheimer's disease appears, at first sight, to be counter-intuitive. Memantine is a low-affinity, voltage-dependent uncompetitive antagonist with fast dissociation kinetics, and it has been proposed that it mediates efficacy through normalizing aberrant, disease-associated low level NMDAR activation without impairing physiological synaptic receptor activation, in a manner somewhat analogous to the endogenous NMDAR channel blocker, magnesium (Parsons *et al*., 2007). As such, it is thought to improve the 'signal to noise' characteristics of NMDAR signalling in the diseased brain.

NR2B-containing NMDARs, which are enriched in the extrasynaptic receptor population, represent plausible candidates for mediating such disease-associated 'background' NMDAR activation. Preclinical studies in healthy adult rats that notably do not exhibit the proposed disease-associated NMDAR dysfunction provide some support for the rationale of selectively targeting NR2B-containing receptors in terms of absence of cognitive impairment and evidence for cognitive enhancement. Thus, CP-101,606 at a dose which fully occupied hippocampal NR2B-containing receptors did not impair spatial learning or memory in the Morris water maze task in healthly adult rats (in contrast to the broad-spectrum channel blocker MK-801; Guscott *et al*., 2003). In addition, while CP-101,606 promoted impulsive-type responding, it improved task performance in a rat delayed match to position task (Higgins *et al*., 2005). Thus, NR2B-selective antagonists may have therapeutic potential as cognitive enhancers in Alzheimer's disease, and Evotec is currently developing EVT-101 for this indication (Table 1).

Cerebral ischaemia and traumatic brain injury

The role of CNS glutamate receptors and, particularly, the highly calcium permeable NMDARs in mediating the excitotoxic neuronal cell damage observed in both cerebral ischaemia and traumatic brain injury is well recognized. Accordingly, broad-spectrum NMDAR antagonists have been shown to be neuroprotective when administered before or shortly after traumatic brain injury or ischaemic insult in animal models (Kemp *et al*., 1999). However, the promise of preclinical data has not been realized in patients with several agents, failing to show efficacy in clinical studies (e.g. Morris *et al*., 1999; Lees *et al*., 2000; Albers *et al*., 2001). It has been speculated that the dose-limiting side effects associated with such broad-spectrum NMDAR antagonists may have contributed to the failure of these studies. NR2B-selective antagonists may offer potential as efficacious neuroprotective agents with an acceptable tolerability profile. In support, data from several studies suggest that activation of extrasynaptic (mostly NR2B-containing) receptors triggers pro-death signalling events, while activation of synaptic (mostly NR2A-containing) receptors favours neuronal survival (Hardingham and Bading, 2003; Zhou and Baudry, 2006; von Engelhardt *et al*., 2007; Liu *et al*., 2007; Chen *et al*., 2008; Martel *et al*., 2009). However, while NR2B-selective antagonists are neuroprotective in animal models with an improved therapeutic index relative to broad-spectrum antagonists (Kemp *et al*., 1999; Tahirovic *et al*., 2008), clinical studies have yielded disappointing outcomes, with CP-101,606 failing to demonstrate efficacy, despite an apparently acceptable tolerability profile (Merchant *et al*., 1999; Saltarelli *et al*., 2004).

Major depression

Following the demonstration of antidepressant-like activity of broad-spectrum NMDAR antagonists in animal models, two small crossover clinical studies have reported a positive antidepressant effect of the NMDAR channel blocker ketamine (Berman *et al*., 2000; Zarate *et al*., 2006). Notably, the antidepressant effect exhibited a rapid onset and persisted for several days after single dose administration (Zarate *et al*., 2006), presenting a potentially attractive therapeutic profile. However, the clinical applicability of ketamine is limited by its psychomimetic activity, which was observed in both studies. Preclinically, NR2B-selective antagonists have also been reported to exhibit antidepressant activity (Maeng and Zarate, 2007), and recently a randomized, double-blind study in patients with refractory major depressive disorder treated with CP-101,606 was reported (Preskorn *et al*., 2008). In this parallel group study, subjects with major depression and a history of treatment refractoriness to selective serotonin reuptake inhibitors (SSRI) first received 6 weeks open-label

treatment with the SSRI paroxetine followed by a single-blind placebo infusion. Paroxetine non-responders (n = 30) were then randomized to a single infusion of CP-101,606 or placebo plus continued treatment with paroxetine for up to a further 4 weeks. CP-101,606 was generally well tolerated and its administration produced a greater antidepressant effect than placebo, thus, illustrating antidepressant potential for NR2B subtype-selective antagonists in otherwise treatment refractory patients. A further clinical study in refractory depression has recently been initiated with MK-0657 (Table 1).

Positive modulation of NR2B-containing NMDA receptors

As discussed above, a number of NMDAR positive modulators have been identified, including polyamines, neurosteroids and Mg^{2+}, some of which exhibit subunit selectivity. Based on the increasing understanding of receptor structure and the molecular mechanisms underlying both positive modulation by such ligands and subunit-selective antagonism, it seems reasonable to expect that appropriately configured screening campaigns might identify novel, subunit-selective small molecule positive modulators. Subunit-selective positive modulation might represent a strategy to enhance receptor function, for example, under pathological conditions of receptor hypofunction, without triggering excitotoxicity through receptor overactivation. NMDAR hypofunction has been implicated in the pathophysiology of schizophrenia, initially based on the psychomimetic activity of the broad-spectrum ion channel blockers, ketamine and PCP, which have been reported to elicit a schizophrenia-like phenotype in healthy volunteers, encompassing the characteristic positive, negative and cognitive symptoms of the disease (see, e.g. Krystal *et al.*, 2005). Subsequent neurophysiological, neuroanatomical and biochemical studies have provided support for disease-associated NMDAR hypofunction (e.g. Umbricht and Krljes, 2005; Hahn *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2008). Efforts to enhance disease-associated receptor hypofunction to date have centred on strategies to enhance glycine site occupancy and, hence, receptor tone, either through the administration of agonists (glycine, D-serine) or via inhibition of the GLYT1 glycine transporter, and these studies have yielded encouraging preliminary data (Javitt, 2008). The preferred target NMDAR subunit for a novel small molecule positive modulator approach is unclear. In support of NR2B, its transgenic overexpression resulted in mice with improved learning and memory (Tang *et al.*, 1999), and gene knockout/knockdown resulted in learning and memory impairments (von Engelhardt *et al.*, 2008). Thus, selective positive modulation of NR2B-containing NMDARs might represent a novel therapeutic strategy for the treatment of schizophrenia and, potentially, other cognitive disorders.

Conclusion

By combining biochemical, structural and functional studies, much progress has been made in recent years in the comprehension of the mechanisms by which extracellular agents can affect NMDAR activity. In particular, it has become increasingly clear that the large NTD of NR2 subunits, which precedes the glutamate-binding domain, is a major site for subunit-specific allosteric modulation. In that respect, receptors incorporating the NR2B subunit appear particularly interesting because the NR2B-NTD not only harbours sites for negative allosteric modulators (such as zinc and ifenprodil) but might also confer a unique sensitivity to the positive allosteric modulators polyamines and Mg^{2+} by participating in an inter-subunit regulatory site. Finally, our increasing understanding of NMDAR structure, function and pharmacology is now translating into promising therapeutic strategies to target NMDAR dysregulation. The therapeutic utility of broad-spectrum NMDAR antagonists is typically limited by their associated side effects. Newer, subtype-selective negative modulators of receptor function, primarily targeting NR2B-containing receptors, have entered clinical development and offer improved potential for the treatment of patients suffering from a range of debilitating psychiatric and neurological disorders. Opportunities for selective positive modulation of NMDARs and to selectively target other NMDAR subtypes or their downstream regulatory cascades are currently more limited but are likely to be a focus of future research. The advent of biological therapeutic agents, such as antibodies (or fragments thereof), and RNA inhibition may also enable therapeutic interventions considered intractable using existing small molecule approaches.

Conflicts of interest

LM and PP declare no conflict of interest. MJG and JK are employees of GlaxoSmithKline PLC.

References

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

Alanine A, Bourson A, Büttelmann B, Gill R, Heitz M-P, Mutel V *et al.* (2003). 1-Benzyloxy-4,5-dihydro-1H-imidazol-2-yl-amines, a novel class of NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 3155–3159.

Albers GV, Goldstein LB, Hall D, Lesko LM (2001). Aptiganel hydrochloride in acute ischemic stroke – a randomized controlled trial. *JAMA* **286**: 2673–2682.

Alberts IL, Nadassy K, Wodak SJ (1998). Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci* **7**: 1700–1716.

Alexander S, Mathie A, Peters J (2008). Guide to receptors and channels (GRAC), 3rd edn (2008 revision). *Br J Pharmacol* **153** (Suppl. 2): S1–S209.

Araneda RC, Lan JY, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV (1999). Spermine and arcaine block and permeate N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J* **76**: 2899–2911.

Banke TG, Dravid SM, Traynelis SF (2005). Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci* **25**: 42–51.

Belelli D, Lambert JJ (2005). Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci* **6**: 565–575.

Benveniste M, Mayer ML (1993). Multiple effects of spermine on

N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol* **464**: 131–163.

Berman RM, Cappiello A, Anand A, Oren DA, Heninger GR, Charney DS *et al*. (2000). Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biol Psychiatry* **47**: 351–354.

Borza I, Bozo E, Barta-Szalai G, Kiss C, Tarkanyi G, Demeter A *et al*. (2007). Selective NR1/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonists among indole-2-carboxamides and benzimidazole-2-carboxamides. *J Med Chem* **50**: 901–914.

Borza I, Domany G (2006). NR2B selective NMDA antagonists: the evolution of the ifenprodil-type pharmacophore. *Curr Top Med Chem* **6**: 687–695.

Borza I, Kolok S, Gere A, Nagy J, Fodor L, Galgoczy K *et al*. (2006). Benzimidazole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 4638–4640.

Bowlby MR (1993). Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal-neurons. *Mol Pharmacol* **43**: 813–819.

Boyce S, Wyatt A, Webb JK, O'Donnell R, Mason G, Rigby M *et al*. (1999). Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology* **38**: 611–623.

Boyce SRRC, Wheeldon A, Rupniak NM, Hill RG (2002). Antinociceptive activity of the NMDA NR2B receptor subtype selective antagonist CP-101,606 in a new rat visceral pain assay. In *IASP Meeting San Diego*, Abstract ID: 848–P118.

Büttelmann B, Alanine A, Bourson A, Gill R, Heitz M-P, Mutel V *et al*. (2003). 2-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2yl)-pyridines as a novel class of NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 829–832.

Carron C, Jullien A, Bucher B (1971). Synthesis and pharmacological properties of a series of 2-piperidino alkanol derivatives. *Arzneimittelforschung* **21**: 1992–1998.

Carter C, Benavides J, Legendre P, Vincent JD, Noel F, Thuret F *et al*. (1988). Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther* **247**: 1222–1232.

Chang HR, Kuo CC (2008). The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci* **28**: 1546–1556.

Chaperon F, Muller W, Auberson YP, Tricklebank MD, Neijt HC (2003). Substitution for PCP, disruption of prepulse inhibition and hyperactivity induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists: preferential involvement of the NR2B rather than NR2A subunit. *Behav Pharmacol* **14**: 477–487.

Chazot PL (2004). The NMDA receptor NR2B subunit: a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem* **11**: 389–396.

Chen M, Lu TJ, Chen XJ, Zhou Y, Chen Q, Feng XY *et al*. (2008). Differential roles of NMDA receptor subtypes in ischemic neuronal cell death and ischemic tolerance. *Stroke* **39**: 3042–3048.

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

Chenard BL, Bordner J, Butler TW, Chambers LK, Collins MA, Decosta DL *et al*. (1995). (1s,2s)-1-(4-hydroxyphenyl)-2-(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol – a potent new neuroprotectant which blocks N-methyl-D-aspartate responses. *J Med Chem* **38**: 3138–3145.

Chenard BL, Menniti FS (1999). Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des* **5**: 381–404.

Chizh BA (2007). Low dose ketamine: a therapeutic and research tool to explore N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor-mediated plasticity in pain pathways. *J Psychopharmacol* **21**: 259–271.

Chizh BA, Headley PM, Tzschentke TM (2001). NMDA receptor antagonists as analgesics: focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci* **22**: 636–642.

Choi YB, Lipton SA (1999). Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn2+ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron* **23**: 171–180.

Claiborne CF, McCauley JA, Libby BE, Curtis NR, Diggle HJ, Kulagowski JJ *et al*. (2003). Orally efficacious NR2B-selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 697–700.

Cull-Candy SG, Leszkiewicz DN (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE* **2004**: re16.

Curtis NR, Diggle HJ, Kulagowski JJ, London C, Grimwood S, Hutson PH *et al*. (2003). Novel N1-(benzyl)cinnamamidine derived NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **13**: 693–696.

Del Dotto P, Pavese N, Gambaccini G, Bernardini S, Metman LV, Chase TN *et al*. (2001). Intravenous amantadine improves levadopa-induced dyskinesias: an acute double-blind placebo-controlled study. *Mov Disord* **16**: 515–520.

Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* **51**: 7–61.

von Engelhardt J, Coserea I, Pawlak V, Fuchs EC, Kohr G, Seeburg PH *et al*. (2007). Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology* **53**: 10–17.

von Engelhardt J, Doganci B, Jensen V, Hvalby O, Gongrich C, Taylor A *et al*. (2008). Contribution of hippocampal and extra-hippocampal NR2B-containing NMDA receptors to performance on spatial learning tasks. *Neuron* **60**: 846–860.

Farkas S, Horvath C, Galgoczy L, Felmerai E, Karsai E, Saghhy K *et al*. (2003). RGH-896 is a novel potent and selective NR2B-NMDA antagonist with efficacy in neuropathic pain models. In *Society for Neuroscience Meeting*, Program # 382.8.

Farrant M, Feldmeyer D, Takahashi T, Cullcandy SG (1994). NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature* **368**: 335–339.

Fayyazuddin A, Villarroel A, Le Goff A, Lerma J, Neyton J (2000). Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn2+ binding to NMDA receptors. *Neuron* **25**: 683–694.

Fischer G, Mutel V, Trube G, Malherbe P, Kew JN, Mohacsi E *et al*. (1997). Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **283**: 1285–1292.

Furukawa H, Gouaux E (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J* **22**: 2873–2885.

Furukawa H, Singh SK, Mancusso R, Gouaux E (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature* **438**: 185–192.

Gallagher MJ, Huang H, Pritchett DB, Lynch DR (1996). Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem* **271**: 9603–9611.

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

Giffard RG, Monyer H, Christine CW, Choi DW (1990). Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures. *Brain Res* **506**: 339–342.

Gill R, Alanine A, Bourson A, Buttelmann B, Fischer G, Heitz MP *et al*. (2002). Pharmacological characterization of Ro 63-1908 (1-[2-(4-hydroxy-phenoxy)-ethyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-ol), a novel subtype-selective N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **302**: 940–948.

Gogas KR (2006). Glutamate-based therapeutic approaches: NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol* **6**: 68–74.

Guscott MR, Clarke HF, Murray F, Grimwood S, Bristow LJ, Hutson PH (2003). The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol* **476**: 193–199.

Hahn CG, Wang HY, Cho DS, Talbot K, Gur RE, Berrettini WH *et al*.

(2006). Altered neuregulin 1-erbB4 signaling contributes to NMDA receptor hypofunction in schizophrenia. *Nat Med* **12**: 824–828.

Han X, Tomitori H, Mizuno S, Higashi K, Full C, Fukiwake T *et al*. (2008). Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-d-aspartate receptor. *J Neurochem* **107**: 1566–1577.

Hardingham GE, Bading H (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci* **26**: 81–89.

Hatton CJ, Paoletti P (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron* **46**: 261–274.

Herin GA, Aizenman E (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol* **500**: 101–111.

Higgins GA, Ballard TM, Enderlin M, Haman M, Kemp JA (2005). Evidence for improved performance in cognitive tasks following selective NR2B NMDA receptor antagonist pre-treatment in the rat. *Psychopharmacology (Berl)* **179**: 85–98.

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

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

Horvath C (2004). *3rd World Cong*. World Inst. Pain: Barcelona. September 21–25.

Hosie AM, Wilkins ME, da Silva HM, Smart TG (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature* **444**: 486–489.

Huggins DJ, Grant GH (2005). The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model* **23**: 381–388.

Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH (2004). A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 8198–8203.

Javitt DC (2008). Glycine transport inhibitors and the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* **63**: 6–8.

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

Kashiwagi K, Pahk AJ, Masuko T, Igarashi K, Williams K (1997). Block and modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons: role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol* **52**: 701–713.

Kemp JA, Kew JNC, Gill R (1999). NMDA receptor antagonists and their potential as neuroprotective agents. In: Jonas P, Monyer H (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology Volume 141. Ionotropic Glutamate Receptors in the CNS*. Springer: Berlin, pp. 495–527.

Kew JN, Kemp JA (1998). An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* **512** (Pt 1): 17–28.

Kew JN, Trube G, Kemp JA (1996). A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. *J Physiol* **497** (Pt 3): 761–772.

Kiss L, Cheng G, Bednar B, Bednar RA, Bennett PB, Kane SA *et al*. (2005). In vitro characterization of novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Neurochem Int* **46**: 453–464.

Köhr G (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res* **326**: 439–446.

Krystal JH, Abi-Saab W, Perry E, D'Souza DC, Liu N, Gueorguieva R *et al*. (2005). Preliminary evidence of attenuation of the disruptive effects of the NMDA glutamate receptor antagonist, ketamine, on working memory by pretreatment with the group II metabotropic glutamate receptor agonist, LY354740, in healthy human subjects. *Psychopharmacology (Berl)* **179**: 303–309.

Lees KR, Asplund K, Carolei A, Davis SM, Diener HC, Kaste M *et al*. (2000). Glycine antagonist (gavestinel) in neuroprotection (GAIN International) in patients with acute stroke: a randomised controlled trial. GAIN International Investigators. *Lancet* **355**: 1949–1954.

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

Li L, Fan M, Icton CD, Chen N, Leavitt BR, Hayden MR *et al*. (2003). Role of NR2B-type NMDA receptors in selective neurodegeneration in Huntington disease. *Neurobiol Aging* **24**: 1113–1121.

Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyakkers A, Liu L, Lai TW *et al*. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* **27**: 2846–2857.

Lopez de Armentia M, Sah P (2003). Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdale: NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci* **23**: 6876–6883.

Loschmann PA, De Groote C, Smith L, Wullner U, Fischer G, Kemp JA *et al*. (2004). Antiparkinsonian activity of Ro 25-6981, a NR2B subunit specific NMDA receptor antagonist, in animal models of Parkinson's disease. *Exp Neurol* **187**: 86–93.

Low CM, Lyuboslavsky P, French A, Le P, Wyatte K, Thiel WH *et al*. (2003). Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol* **63**: 1212–1222.

Low CM, Zheng F, Lyuboslavsky P, Traynelis SF (2000). Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11062–11067.

Lu WY, Xiong ZG, Orser BA, MacDonald JF (1998). Multiple sites of action of neomycin, Mg2+ and spermine on the NMDA receptors of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones. *J Physiol* **512** (Pt 1): 29–46.

Luo J, Wang Y, Yasuda RP, Dunah AW, Wolfe BB (1997). The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol* **51**: 79–86.

Ma QP, Hargreaves RJ (2000). Localization of N-methyl-D-aspartate NR2B subunits on primary sensory neurons that give rise to small-caliber sciatic nerve fibers in rats. *Neuroscience* **101**: 699–707.

McCauley JA (2007). NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. In *3rd Anglo-Swedish Medicinal Chemistry Symposium*. Are, Sweden.

McCauley JA, Bednar RA, Bednar B, Butcher JW, Claiborne CF, Claremon DA *et al*. (2008). NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. In *Abstracts – 236th ACS National Meeting*. Philadelphia, PA, August 17–21, 2008.

McGurk JF, Bennett MV, Zukin RS (1990). Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 9971–9974.

Maeng S, Zarate CA Jr (2007). The role of glutamate in mood disorders: results from the ketamine in major depression study and the presumed cellular mechanism underlying its antidepressant effects. *Curr Psychiatry Rep* **9**: 467–474.

Makani S, Chesler M (2007). Endogenous alkaline transients boost postsynaptic NMDA receptor responses in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* **27**: 7438–7446.

Malayev A, Gibbs TT, Farb DH (2002). Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *Br J Pharmacol* **135**: 901–909.

Malherbe P, Mutel V, Broger C, Perin-Dureau F, Kemp JA, Neyton J *et al*. (2003). Identification of critical residues in the amino terminal domain of the human NR2B subunit involved in the RO 25-6981 binding pocket. *J Pharmacol Exp Ther* **307**: 897–905.

Martel MA, Wyllie DJ, Hardingham GE (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience* **158**: 334–343.

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

Mayer ML (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature* **440**: 456–462.

Merchant RE, Bullock MR, Carmack CA, Shah AK, Wilner KD, Ko G *et al*. (1999). A double-blind, placebo-controlled study of the safety, tolerability and pharmacokinetics of CP-101,606 in patients with a mild or moderate traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* **890**: 42–50.

Montastruc JL, Rascol O, Senard JM, Rascol A (1992). A pilot study of N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist in Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **55**: 630–631.

Mony L, Krzaczkowski L, Leonetti M, Goff AL, Alarcon K, Neyton J *et al*. (2009). Structural basis of NR2B-selective antagonist recognition by N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **75**: 60–74.

Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* **12**: 529–540.

Morris GF, Bullock R, Marshall SB, Marmarou A, Maas A, Marshall LF (1999). Failure of the competitive N-methyl-D-aspartate antagonist Selfotel (CGS 19755) in the treatment of severe head injury: results of two phase III clinical trials. *J Neurosurg* **91**: 737–743.

Mott DD, Doherty JJ, Zhang S, Washburn MS, Fendley MJ, Lyuboslavsky P *et al*. (1998). Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci* **1**: 659–667.

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

Ng FM, Geballe MT, Snyder JP, Traynelis SF, Low CM (2008). Structural insights into phenylethanolamines high-affinity binding site in NR2B from binding and molecular modeling studies. *Mol Brain* **1**: 16.

Ng FM, Soh W, Geballe MT, Low CM (2007). Improving solubility of NR2B amino-terminal domain of N-methyl-d-aspartate receptor expressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **362**: 69–74.

Nicholson KL, Mansbach RS, Menniti FS, Balster RL (2007). The phencyclidine-like discriminative stimulus effects and reinforcing properties of the NR2B-selective N-methyl-D-aspartate antagonist CP-101 606 in rats and rhesus monkeys. *Behav Pharmacol* **18**: 731–743.

Nikam SS, Meltzer LT (2002). NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Curr Pharm Des* **8**: 845–855.

Nutt JG, Gunzler SA, Kirchhoff T, Hogarth P, Weaver JL, Krams M *et al*. (2008). Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and Parkinsonism. *Mov Disord* **23**: 1860–1866.

O'Hara PJ, Sheppard PO, Thogersen H, Venezia D, Haldeman BA, McGrane V *et al*. (1993). The ligand-binding domain in metabotropic glutamate receptors is related to bacterial periplasmic binding-proteins. *Neuron* **11**: 41–52.

Pahk AJ, Williams K (1997). Influence of extracellular pH on inhibition by ifenprodil at N-methyl-D-aspartate receptors in Xenopus oocytes. *Neurosci Lett* **225**: 29–32.

Paoletti P, Ascher P, Neyton J (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci* **17**: 5711–5725.

Paoletti P, Neyton J (2007). NMDA receptor subunits: function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol* **7**: 39–47.

Paoletti P, Neyton J, Ascher P (1995). Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg2+. *Neuron* **15**: 1109–1120.

Paoletti P, Perin-Dureau F, Fayyazuddin A, Goff AL, Callebaut I, Neyton J (2000). Molecular organization of a zinc binding N-terminal modulatory domain in a NMDA receptor subunit. *Neuron* **28**: 911–925.

Paoletti P, Vergnano AM, Barbour B, Casado M (2009). Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience* **158**: 126–136.

Park-Chung M, Wu FS, Purdy RH, Malayev AA, Gibbs TT, Farb DH (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Mol Pharmacol* **52**: 1113–1123.

Parkchung MJ, Wu FS, Farb DH (1994). 3-alpha-hydroxy-5-beta-pregnan-20-one sulfate – a negative modulator of the NMDA-induced current in cultured neurons. *Mol Pharmacol* **46**: 146–150.

Parsons CG, Stoffler A, Danysz W (2007). Memantine: a NMDA receptor antagonist that improves memory by restoration of homeostasis in the glutamatergic system – too little activation is bad, too much is even worse. *Neuropharmacology* **53**: 699–723.

Perin-Dureau F, Rachline J, Neyton J, Paoletti P (2002). Mapping the binding site of the neuroprotectant ifenprodil on NMDA receptors. *J Neurosci* **22**: 5955–5965.

Petrovic M, Sedlacek M, Horak M, Chodounska H, Vyklicky L (2005). 20-oxo-5 beta-pregnan-3 alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *J Neurosci* **25**: 8439–8450.

Pinheiro PS, Mulle C (2008). Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci* **9**: 423–436.

Preskorn SH, Baker B, Kolluri S, Menniti FS, Krams M, Landen JW (2008). An innovative design to establish proof of concept of the antidepressant effects of the NR2B subunit selective N-methyl-D-aspartate antagonist, CP-101,606, in patients with treatment-refractory major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* **28**: 631–637.

Rachline J, Perin-Dureau F, Goff AL, Neyton J, Paoletti P (2005). The micromolar zinc-binding domain on the NMDA receptor subunit NR2B. *J Neurosci* **25**: 308–317.

Robel P, Baulieu EE (1994). Neurosteroids biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab* **5**: 1–8.

Rock DM, MacDonald RL (1992). Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol Pharmacol* **42**: 157–164.

Rock DM, Macdonald RL (1995). Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **35**: 463–482.

Rumbaugh G, Prybylowski K, Wang JF, Vicini S (2000). Exon 5 and spermine regulate deactivation of NMDA receptor subtypes. *J Neurophysiol* **83**: 1300–1306.

Saltarelli MD, Weaver JJ, Hsu C, Bednar MM (2004). Randomized double-blind, placebo-controlled study to evaluate the safety and efficacy of CP-101,606 (traxoprodil), an NR2B-selective N-methyl D-aspartate receptor antagonist, in subjects with acute ischemic stroke. *Stroke* **35**: 241–241.

Sang CN, Weaver JJ, Jinga L, Wouden J, Saltarelli MD (2003). The NR2B subunit-selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 reduces pain intensity in patients with central and peripheral neuropathic pain. In *Society for Neuroscience*, Meeting. Program # 814.9.

Scimemi A, Fine A, Kullmann DM, Rusakov DA (2004). NR2B-containing receptors mediate cross talk among hippocampal synapses. *J Neurosci* **24**: 4767–4777.

Silver RA, Traynelis SF, Cull-Candy SG (1992). Rapid-time-course miniature and evoked excitatory currents at cerebellar synapses in situ. *Nature* **355**: 163–166.

Steece-Collier K, Chambers LK, Jaw-Tsai SS, Menniti FS, Greenamyre JT (2000). Antiparkinsonian actions of CP-101,606, an antagonist of NR2B subunit-containing N-methyl-d-aspartate receptors. *Exp Neurol* **163**: 239–243.

Suetake-Koga S, Shimazaki T, Takamori K, Chaki S, Kanuma K, Sekiguchi Y *et al*. (2006). In vitro and antinociceptive profile of HON0001,

an orally active NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Pharmacol Biochem Behav* **84**: 134–141.

Sun Y, Olson R, Horning M, Armstrong N, Mayer M, Gouaux E (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature* **417**: 245–253.

Tahirovic YA, Geballe M, Gruszecka-Kowalik E, Myers SJ, Lyuboslavsky P, Le P *et al*. (2008). Enantiomeric propanolamines as selective N-methyl-D-aspartate 2B receptor antagonists. *J Med Chem* **51**: 5506–5521.

Tamiz AP, Cai SX, Zhou Z-L, Yuen P-W, Shelkun RM, Whittemore ER *et al*. (1999). Structure-activity relationship of N(Phenylalkyl)cinnamides as novel NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. *J Med Chem* **42**: 3412–3420.

Tan PH, Yang LC, Shih HC, Lan KC, Cheng JT (2005). Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat. *Gene Ther* **12**: 59–66.

Tang CM, Dichter M, Morad M (1990). Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H+. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 6445–6449.

Tang YP, Shimizu E, Dube GR, Rampon C, Kerchner GA, Zhuo M *et al*. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature* **401**: 63–69.

Taniguchi K, Shinjo K, Mizutani M, Shimada K, Ishikawa T, Menniti FS *et al*. (1997). Antinociceptive activity of CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit antagonist. *Br J Pharmacol* **122**: 809–812.

Traynelis SF, Burgess MF, Zheng F, Lyuboslavsky P, Powers JL (1998). Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci* **18**: 6163–6175.

Traynelis SF, Cull-Candy SG (1990). Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature* **345**: 347–350.

Traynelis SF, Hartley M, Heinemann SF (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science* **268**: 873–876.

Trube G, Ehrhard P, Malherbe P, Huber G (1996). The selectivity of Ro25-6981 for NMDA receptor subtypes expressed in Xenopus oocytes. *Soc Neurosci Abstr* **22**: 693–694.

Umbricht D, Krljes S (2005). Mismatch negativity in schizophrenia: a meta-analysis. *Schizophr Res* **76**: 1–23.

Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R (2000). The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* **26**: 187–196.

Vyklicky L Jr, Vlachova V, Krusek J (1990). The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol* **430**: 497–517.

Wang LY, MacDonald JF (1995). Modulation by magnesium of the affinity of NMDA receptors for glycine in murine hippocampal neurones. *J Physiol* **486**: 83–95.

Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992). Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport* **3**: 1138–1140.

Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1993). Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol* **338**: 377–390.

Watanabe M, Mishina M, Inoue Y (1994). Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J Comp Neurol* **345**: 314–319.

Weaver CE, Land MB, Purdy RH, Richards KG, Gibbs TT, Farb DH (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca2+ accumulation and cell death. *J Pharm Exp Ther* **293**: 747–754.

Wei F, Wang GD, Kerchner GA, Kim SJ, Xu HM, Chen ZF *et al*. (2001). Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci* **4**: 164–169.

Wessell RH, Ahmed SM, Menniti FS, Dunbar GL, Chase TN, Oh JD (2004). NR2B selective NMDA receptor antagonist CP-101,606 prevents levodopa-induced motor response alterations in hemiparkinsonian rats. *Neuropharm* **47**: 184–194.

Williams K (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor-selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol Pharmacol* **44**: 851–859.

Williams K (1994a). Mechanisms influencing stimulatory effects of spermine at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* **46**: 161–168.

Williams K (1994b). Subunit-specific potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors by histamine. *Mol Pharmacol* **46**: 531–541.

Williams K, Kashiwagi K, Fukuchi J, Igarashi K (1995). An acidic amino acid in the N-methyl-D-aspartate receptor that is important for spermine stimulation. *Mol Pharmacol* **48**: 1087–1098.

Williams K, Zappia AM, Pritchett DB, Shen YM, Molinoff PB (1994). Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol Pharmacol* **45**: 803–809.

Wilson AW, Medhurst SJ, Dixon CI, Bontoft NC, Winyard LA, Brackenborough KT *et al*. (2006). An animal model of chronic inflammatory pain: pharmacological and temporal differentiation from acute models. *Eur J Pain* **10**: 537–549.

Wong E, Ng FM, Yu CY, Lim P, Lim LH, Traynelis SF *et al*. (2005). Expression and characterization of soluble amino-terminal domain of NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor. *Protein Sci* **14**: 2275–2283.

Woo TUW, Kim AM, Viscidi E (2008). Disease-specific alterations in glutamatergic neurotransmission on inhibitory interneurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res* **1218**: 267–277.

Woodhall G, Evans DI, Cunningham MO, Jones RS (2001). NR2B-containing NMDA autoreceptors at synapses on entorhinal cortical neurons. *J Neurophysiol* **86**: 1644–1651.

Wu FS, Gibbs TT, Farb DH (1991). Pregnenolone sulfate – a positive allosteric modulator at the N-methyl-D-aspartate receptor. *Mol Pharmacol* **40**: 333–336.

Zarate CA Jr, Singh JB, Quiroz JA, De Jesus G, Denicoff KK, Luckenbaugh DA *et al*. (2006). A double-blind, placebo-controlled study of memantine in the treatment of major depression. *Am J Psychiatry* **163**: 153–155.

Zeron MM, Hansson O, Chen N, Wellington CL, Leavitt BR, Brundin P *et al*. (2002). Increased sensitivity to N-methyl-D-aspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease. *Neuron* **33**: 849–860.

Zhang L, Zheng X, Paupard MC, Wang AP, Santchi L, Friedman LK *et al*. (1994). Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 10883–10887.

Zhou M, Baudry M (2006). Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci* **26**: 2956–2963.

Bibliographie

Acher, F. C. and Bertrand, H. O. (2005). Amino acid recognition by Venus flytrap domains is encoded in an 8-residue motif. *Biopolymers*, 80(2-3) :357–66. [cité pages 74 et 75]

Ahier, A., Rondard, P., Gouignard, N., Khayath, N., Huang, S., Trolet, J., Donoghue, D. J., Gauthier, M., Pin, J. P., and Dissous, C. (2009). A new family of receptor tyrosine kinases with a venus flytrap binding domain in insects and other invertebrates activated by aminoacids. *PLoS One*, 4(5) :e5651. [cité pages 65, 76 et 77]

Akazawa, C., Shigemoto, R., Bessho, Y., Nakanishi, S., and Mizuno, N. (1994). Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J Comp Neurol*, 347(1) :150–60. [cité pages 34 et 35]

Alarcon, K., Martz, A., Mony, L., Neyton, J., Paoletti, P., Goeldner, M., and Foucaud, B. (2008). Reactive derivatives for affinity labeling in the ifenprodil site of NMDA receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 18(9) :2765–2770. [cité page 212]

Alberts, I. L., Nadassy, K., and Wodak, S. J. (1998). Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures. *Protein Sci*, 7(8) :1700–16. [cité page 110]

Araneda, R. C., Lan, J. Y., Zheng, X., Zukin, R. S., and Bennett, M. V. (1999). Spermine and arcaine block and permeate N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Biophys J*, 76(6) :2899–911. [cité page 119]

Armstrong, N. and Gouaux, E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor : crystal structures of the GluR2 ligand binding core. *Neuron*, 28(1) :165–81. [cité pages 48, 51, 52, 54 et 152]

Armstrong, N., Jasti, J., Beich-Frandsen, M., and Gouaux, E. (2006). Measurement of conformational changes accompanying desensitization in an ionotropic glutamate receptor. *Cell*, 127(1) :85–97. [cité page 52]

Armstrong, N., Sun, Y., Chen, G. Q., and Gouaux, E. (1998). Structure of a glutamate-receptor ligand-binding core in complex with kainate. *Nature*, 395(6705) :913–7. [cité page 43]

Attwell, D. and Gibb, A. (2005). Neuroenergetics and the kinetic design of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci*, 6(11) :841–9. [cité pages 27, 28 et 39]

Auberson, Y. P., Allgeier, H., Bischoff, S., Lingenhoehl, K., Moretti, R., and Schmutz, M. (2002). 5-Phosphonomethylquinoxalinediones as competitive NMDA receptor antagonists with a preference for the human 1A/2A, rather than 1A/2B receptor composition. *Bioorg Med Chem Lett*, 12(7) :1099–102. [cité page 132]

Ayalon, G., Segev, E., Elgavish, S., and Stern-Bach, Y. (2005). Two regions in the N-terminal domain of ionotropic glutamate receptor 3 form the subunit oligomerization interfaces that control subtype-specific receptor assembly. *J Biol Chem*, 280(15) :15053–60. [cité pages 40, 42 et 87]

Ayalon, G. and Stern-Bach, Y. (2001). Functional assembly of AMPA and kainate receptors is mediated by several discrete protein-protein interactions. *Neuron*, 31(1) :103–13. [cité pages 42 et 90]

Baker, D. and Sali, A. (2001). Protein structure prediction and structural genomics. *Science*, 294(5540) :93–6. [cité pages 152 et 153]

Ballard, T. M., Pauly-Evers, M., Higgins, G. A., Ouagazzal, A. M., Mutel, V., Borroni, E., Kemp, J. A., Bluethmann, H., and Kew, J. N. C. (2002). Severe impairment of NMDA receptor function in mice carrying targeted point mutations in the glycine binding site results in drug-resistant nonhabituating hyperactivity. *Journal of Neuroscience*, 22(15) :6713–6723. [cité page 143]

Banke, T. G., Dravid, S. M., and Traynelis, S. F. (2005). Protons trap NR1/NR2B NMDA receptors in a nonconducting state. *J Neurosci*, 25(1) :42–51. [cité page 106]

Barbour, B. and Hausser, M. (1997). Intersynaptic diffusion of neurotransmitter. *Trends in Neurosciences*, 20(9) :377–384. [cité page 39]

Barta-Szalai, G., Borza, I., Bozo, E., Kiss, C., Agai, B., Proszenyak, A., Keseru, G. M., Gere, A., Kolok, S., Galgoczy, K., Horvath, C., Farkas, S., and Domany, G. (2004). Oxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(15) :3953–3956. [cité page 241]

Bats, C., Groc, L., and Choquet, D. (2007). The interaction between Stargazin and PSD-95 regulates AMPA receptor surface trafficking. *Neuron*, 53(5) :719–34. [cité page 321]

Belelli, D. and Lambert, J. J. (2005). Neurosteroids : endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci*, 6(7) :565–75. [cité page 124]

Benveniste, M. and Mayer, M. L. (1991). Kinetic-Analysis of Antagonist Action at N-Methyl-D-Aspartic Acid Receptors - 2 Binding-Sites Each for Glutamate and Glycine. *Biophysical Journal*, 59(3) :560–573. [cité page 38]

Benveniste, M. and Mayer, M. L. (1993). Multiple effects of spermine on N-methyl-D-aspartic acid receptor responses of rat cultured hippocampal neurones. *J Physiol*, 464 :131–63. [cité pages 117, 118, 119, 120, 254 et 263]

Bertrand, H. O., Bessis, A. S., Pin, J. P., and Acher, F. C. (2002). Common and selective molecular determinants involved in metabotopic glutamate receptor agonist activity. *J Med Chem*, 45(15) :3171–83. [cité pages 76 et 262]

Beurrier, C., Lopez, S., Revy, D., Selvam, C., Goudet, C., Lherondel, M., Gubellini, P., Kerkerian-LeGoff, L., Acher, F., Pin, J. P., and Amalric, M. (2009). Electrophysiological and behavioral evidence that modulation of metabotropic glutamate receptor 4 with a new agonist reverses experimental parkinsonism. *Faseb Journal*, 23(10) :3619–3628. [cité page 24]

Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., and Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(33) :14126–31. [cité pages 37 et 111]

Bixel, M. G., Weise, C., Bolognesi, M. L., Rosini, M., Brierly, M. J., Mellor, I. R., Usherwood, P. N., Melchiorre, C., and Hucho, F. (2001). Location of the polyamine binding site in the vestibule of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *J Biol Chem*, 276(9) :6151–60. [cité page 295]

Blanke, M. L. and VanDongen, A. M. (2008). Constitutive activation of the N-methyl-D-aspartate receptor via cleft-spanning disulfide bonds. *J Biol Chem*, 283(31) :21519–29. [cité pages 52 et 279]

Borza, I. and Domany, G. (2006). NR2B selective NMDA antagonists : The evolution of the ifenprodil-type pharmacophore. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(7) :687–695. [cité pages 215 et 232]

Borza, I., Kolok, S., Gere, A., Agai-Csongor, E., Agai, B., Tarkanyi, G., Horvath, C., Barta-Szalai, G., Bozo, E., Kiss, C., Bielik, A., Nagy, J., Farkas, S., and Domany, G. (2003). Indole-2-carboxamides as novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(21) :3859–3861. [cité page 246]

Bowie, D. and Mayer, M. L. (1995). Inward Rectification of Both Ampa and Kainate Subtype Glutamate Receptors Generated by Polyamine-Mediated Ion-Channel Block. *Neuron*, 15(2) :453–462. [cité page 117]

Bowlby, M. R. (1993). Pregnenolone Sulfate Potentiation of N-Methyl-D-Aspartate Receptor Channels in Hippocampal-Neurons. *Molecular Pharmacology*, 43(5) :813–819. [cité pages 124 et 125]

Boyce, S., Wyatt, A., Webb, J. K., O'Donnell, R., Mason, G., Rigby, M., Sirinathsinghji, D., Hill, R. G., and Rupniak, N. M. (1999). Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction : correlation with restricted localisation of NR2B subunit in dorsal horn. *Neuropharmacology*, 38(5) :611–23. [cité page 142]

Brickley, S. G., Misra, C., Mok, M. H. S., Mishina, M., and Cull-Candy, S. G. (2003). NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *Journal of Neuroscience*, 23(12) :4958–4966. [cité page 33]

Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1992). Divalent Ion Permeability of Ampa Receptor Channels Is Dominated by the Edited Form of a Single Subunit. *Neuron*, 8(1) :189–198. [cité page 29]

Butler, T. W., Blake, J. F., Bordner, J., Butler, P., Chenard, B. L., Collins, M. A., DeCosta, D., Ducat, M. J., Eisenhard, M. E., Menniti, F. S., Pagnozzi, M. J., Sands, S. B., Segelstein, B. E., Volberg, W., White, W. F., and Zhao, D. Y. (1998). (3R,4S)-3- 4-(4-fluorophenyl)-4-hydroxypiperidin-1-yl chroman-4,7-diol : A conformationally restricted analogue of the NR2B subtype-selective NMDA antagonist (1S,2S)-1-(4-hydroxyphenyl)-2(4-hydroxy-4-phenylpiperidino)-1-propanol. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(7) :1172–1184. [cité page 241]

Buttelmann, B., Alanine, A., Bourson, A., Gill, R., Heitz, M. P., Mutel, V., Pinard, E., Trube, G., and Wyler, R. (2003). 4-(3,4-Dihydro-1H-isoquinolin-2yl)-pyridines and 4-(3,4-dihydro-1H-isoquinolin-2-yl)-quinolines as potent NR1/2B subtype selective NMDA receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(10) :1759–1762. [cité page 232]

Cao, L. H. and Yang, Y. L. (2008). Natriuretic peptides and their receptors in the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 84(3) :234–248. [cité page 84]

Carron, C., Jullien, A., and Bucher, B. (1971). Synthesis and pharmacological properties of a series of 2-piperidino alkanol derivatives. *Arzneimittelforschung*, 21(12) :1992–8. [cité page 112]

Carter, C., Benavides, J., Legendre, P., Vincent, J. D., Noel, F., Thuret, F., Lloyd, K. G., Arbilla, S., Zivkovic, B., MacKenzie, E. T., and et al. (1988). Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral anti-ischemic agents. II. Evidence for N-methyl-D-aspartate receptor antagonist properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 247(3) :1222–32. [cité pages 112 et 218]

Carter, C. J., Lloyd, K. G., Zivkovic, B., and Scatton, B. (1990). Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral antiischemic agents. III. Evidence for antagonistic effects at the polyamine modulatory site within the N-methyl-D-aspartate receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther*, 253(2) :475–82. [cité page 121]

Chang, H. R. and Kuo, C. C. (2008). The activation gate and gating mechanism of the NMDA receptor. *J Neurosci*, 28(7) :1546–56. [cité page 44]

Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J. K., Tu, S. C., Kevin, A. S. K., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., and Zhang, D. X. (2002). Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits. *Nature*, 415(6873) :793–798. [cité pages 33 et 145]

Chaudhry, C., Plested, A. J., Schuck, P., and Mayer, M. L. (2009a). Energetics of glutamate receptor ligand binding domain dimer assembly are modulated by allosteric ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(30) :12329–34. [cité pages 315 et 317]

Chaudhry, C., Weston, M. C., Schuck, P., Rosenmund, C., and Mayer, M. L. (2009b). Stability of ligand-binding domain dimer assembly controls kainate receptor desensitization. *Embo J*, 28(10) :1518–30. [cité page 55]

Chazot, P. L. (2004). The NMDA receptor NR2B subunit : a valid therapeutic target for multiple CNS pathologies. *Curr Med Chem*, 11(3) :389–96. [cité pages 138, 141 et 215]

Chazot, P. L., Coleman, S. K., Cik, M., and Stephenson, F. A. (1994). Molecular Characterization of N-Methyl-D-Aspartate Receptors Expressed in Mammalian-Cells Yields Evidence for the Coexistence of 3 Subunit Types within a Discrete Receptor Molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 269(39) :24403–24409. [cité page 33]

Chazot, P. L. and Stephenson, F. A. (1997). Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon : Direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *Journal of Neurochemistry*, 69(5) :2138–2144. [cité page 33]

Chen, L., Chetkovich, D. M., Petralia, R. S., Sweeney, N. T., Kawasaki, Y., Wenthold, R. J., Bredt, D. S., and Nicoll, R. A. (2000). Stargazin regulates synaptic targeting of AMPA receptors by two distinct mechanisms. *Nature*, 408(6815) :936–43. [cité page 321]

Chen, N. S., Luo, T., and Raymond, L. A. (1999). Subtype-dependence of NMDA receptor channel open probability. *Journal of Neuroscience*, 19(16) :6844–6854. [cité pages 38, 276 et 279]

Chenard, B. L., Bordner, J., Butler, T. W., Chambers, L. K., Collins, M. A., Decosta, D. L., Ducat, M. F., Dumont, M. L., Fox, C. B., Mena, E. E., Menniti, F. S., Nielsen, J., Pagnozzi, M. J., Richter, K. E. G., Ronau, R. T., Shalaby, I. A., Stemple, J. Z., and White, W. F. (1995). (1s,2s)-1-(4-Hydroxyphenyl)-2-(4-Hydroxy-4-Phenylpiperidino)-1-Propanol - a Potent

New Neuroprotectant Which Blocks N-Methyl-D-Aspartate Responses. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(16) :3138–3145. [cité page 138]

Chenard, B. L. and Menniti, F. S. (1999). Antagonists selective for NMDA receptors containing the NR2B subunit. *Curr Pharm Des*, 5(5) :381–404. [cité page 215]

Chizh, B. A., Headley, P. M., and Tzschentke, T. M. (2001). NMDA receptor antagonists as analgesics : focus on the NR2B subtype. *Trends Pharmacol Sci*, 22(12) :636–42. [cité pages 130, 142 et 151]

Choi, Y. B. and Lipton, S. A. (1999). Identification and mechanism of action of two histidine residues underlying high-affinity Zn2+ inhibition of the NMDA receptor. *Neuron*, 23(1) :171–80. [cité pages 108, 115, 116 et 311]

Claiborne, C. F., McCauley, J. A., Libby, B. E., Curtis, N. R., Diggle, H. J., Kulagowski, J. J., Michelson, S. R., Anderson, K. D., Claremon, D. A., Freidinger, R. M., Bednar, R. A., Mosser, S. D., Gaul, S. L., Connolly, T. M., Condra, C. L., Bednar, B., Stump, G. L., Lynch, J. J., Macaulay, A., Wafford, K. A., Koblan, K. S., and Liverton, N. J. (2003). Orally efficacious NR2B-selective NMDA receptor antagonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 13(4) :697–700. [cité page 245]

Clamp, M., Cuff, J., Searle, S. M., and Barton, G. J. (2004). The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3) :426–7. [cité page 285]

Clayton, A., Siebold, C., Gilbert, R. J., Sutton, G. C., Harlos, K., McIlhinney, R. A., Jones, E. Y., and Aricescu, A. R. (2009). Crystal structure of the GluR2 amino-terminal domain provides insights into the architecture and assembly of ionotropic glutamate receptors. *J Mol Biol*, 392(5) :1125–32. [cité pages 40, 42, 77, 87, 95, 195, 210, 303, 317, 318 et 321]

Clements, J. D. and Westbrook, G. L. (1991). Activation Kinetics Reveal the Number of Glutamate and Glycine Binding-Sites on the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Neuron*, 7(4) :605–613. [cité page 38]

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(5) :924–47. [cité page 291]

Conn, P. J., Christopoulos, A., and Lindsley, C. W. (2009). Allosteric modulators of GPCRs : a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov*, 8(1) :41–54. [cité page 24]

Corti, C., Battaglia, G., Molinaro, G., Riozzi, B., Pittaluga, A., Corsi, M., Mugnaini, M., Nicoletti, F., and Bruno, V. (2007). The use of knock-out mice unravels distinct roles for mGlu2 and mGlu3 metabotropic glutamate receptors in mechanisms of neurodegeneration/neuroprotection. *J Neurosci*, 27(31) :8297–308. [cité page 23]

Coughenour, L. L. and Cordon, J. J. (1997). Characterization of haloperidol and trifluperidol as subtype-selective N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists using [3H]TCP and [3H]ifenprodil binding in rat brain membranes. *J Pharmacol Exp Ther*, 280(2) :584–92. [cité page 232]

Cull-Candy, S., Brickley, S., and Farrant, M. (2001). NMDA receptor subunits : diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 11(3) :327–35. [cité pages 33, 37 et 231]

Cull-Candy, S. G. and Leszkiewicz, D. N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci STKE*, 2004(255) :re16. [cité page 37]

Curtis, N. R., Diggle, H. J., Kulagowski, J. J., London, C., Grimwood, S., Hutson, P. H., Murray, F., Richards, P., Macaulay, A., and Wafford, K. A. (2003). Novel N-1-(benzyl)cinnamamidine derived NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 13(4) :693–696. [cité page 245]

Das, S., Sasaki, Y. F., Rothe, T., Premkumar, L. S., Takasu, M., Crandall, J. E., Dikkes, P., Conner, D. A., Rayudu, P. V., Cheung, W., Chen, H. S. V., Lipton, S. A., and Nakanishi, N. (1998). Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*, 393(6683) :377–381. [cité page 33]

Dingledine, R., Borges, K., Bowie, D., and Traynelis, S. F. (1999). The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, 51(1) :7–61. [cité pages 23, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 38, 39, 101, 231 et 253]

Dravid, S. M., Prakash, A., and Traynelis, S. F. (2008). Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors. *Journal of Physiology-London*, 586(18) :4425–4439. [cité pages 38 et 276]

Drewett, J. G. and Garbers, D. L. (1994). The Family of Guanylyl Cyclase Receptors and Their Ligands. *Endocrine Reviews*, 15(2) :135–162. [cité page 84]

Dunah, A. W., Luo, J. H., Wang, Y. H., Yasuda, R. P., and Wolfe, B. B. (1998). Subunit composition of N-methyl-D-aspartate receptors in the central nervous system that contain the NR2D subunit. *Molecular Pharmacology*, 53(3) :429–437. [cité page 33]

Durand, G. M., Bennett, M. V. L., and Zukin, R. S. (1993). Splice Variants of the N-Methyl-D-Aspartate Receptor NR1 Identify Domains Involved in Regulation by Polyamines and Protein-Kinase-C (Vol 90, Pg 6731, 1993). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(20) :9739–9739. [cité pages 34, 120, 254, 312, 313 et 315]

Erreger, K., Dravid, S. M., Banke, T. G., Wyllie, D. J., and Traynelis, S. F. (2005). Subunit-specific gating controls rat NR1/NR2A and NR1/NR2B NMDA channel kinetics and synaptic signalling profiles. *J Physiol*, 563(Pt 2) :345–58. [cité pages 38 et 276]

Fage, D., Voltz, C., Scatton, B., and Carter, C. (1992). Selective release of spermine and spermidine from the rat striatum by N-methyl-D-aspartate receptor activation in vivo. *J Neurochem*, 58(6) :2170–5. [cité page 123]

Fayyazuddin, A., Villarroel, A., Le Goff, A., Lerma, J., and Neyton, J. (2000). Four residues of the extracellular N-terminal domain of the NR2A subunit control high-affinity Zn2+ binding to NMDA receptors. *Neuron*, 25(3) :683–94. [cité pages 57, 108 et 110]

Feng, B., Tse, H. W., Skifter, D. A., Morley, R., Jane, D. E., and Monaghan, D. T. (2004). Structure-activity analysis of a novel NR2C/NR2D-preferring NMDA receptor antagonist : 1-(phenanthrene-2-carbonyl) piperazine-2,3-dicarboxylic acid. *Br J Pharmacol*, 141(3) :508–16. [cité page 135]

Fernandes, H. B., Catches, J. S., Petralia, R. S., Copits, B. A., Xu, J., Russell, T. A., Swanson, G. T., and Contractor, A. (2009). High-affinity kainate receptor subunits are necessary for ionotropic but not metabotropic signaling. *Neuron*, 63(6) :818–29. [cité page 32]

Fischer, G., Mutel, V., Trube, G., Malherbe, P., Kew, J. N., Mohacsi, E., Heitz, M. P., and Kemp, J. A. (1997). Ro 25-6981, a highly potent and selective blocker of N-methyl-D-aspartate receptors containing the NR2B subunit. Characterization in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*, 283(3) :1285–92. [cité pages 138 et 241]

Foucaud, B., Ferret, P., Grutter, T., and Goeldner, M. (2001). Cysteine mutants as chemical sensors for ligand-receptor interactions. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22(4) :170–173. [cité pages 155 et 156]

Foucaud, B., Laube, B., Schemm, R., Kreimeyer, A., Goeldner, M., and Betz, H. (2003). Structural model of the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site probed by site-directed chemical coupling. *J Biol Chem*, 278(26) :24011–7. [cité page 155]

Frizelle, P. A., Chen, P. E., and Wyllie, D. J. (2006). Equilibrium constants for (R)-[(S)-1-(4-bromo-phenyl)-ethylamino]-(2,3-dioxo-1,2,3,4-tetrahydroquino xalin-5-yl)-methyl]-phosphonic acid (NVP-AAM077) acting at recombinant NR1/NR2A and NR1/NR2B N-methyl-D-aspartate receptors : Implications for studies of synaptic transmission. *Mol Pharmacol*, 70(3) :1022–32. [cité pages 132 et 135]

Furukawa, H. and Gouaux, E. (2003). Mechanisms of activation, inhibition and specificity : crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *Embo J*, 22(12) :2873–85. [cité pages 43, 52 et 156]

Furukawa, H., Singh, S. K., Mancusso, R., and Gouaux, E. (2005). Subunit arrangement and function in NMDA receptors. *Nature*, 438(7065) :185–192. [cité pages 38, 43, 49, 51, 55 et 152]

Gallagher, M. J., Huang, H., Grant, E. R., and Lynch, D. R. (1997). The NR2B-specific interactions of polyamines and protons with the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*, 272(40) :24971–9. [cité pages 122, 255, 265, 269 et 300]

Gallagher, M. J., Huang, H., Pritchett, D. B., and Lynch, D. R. (1996). Interactions between ifenprodil and the NR2B subunit of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(16) :9603–9611. [cité pages 113 et 151]

Galvez, T., Prezeau, L., Milioti, G., Franek, M., Joly, C., Froestl, W., Bettler, B., Bertrand, H. O., Blahos, J., and Pin, J. P. (2000). Mapping the agonist-binding site of GABA(B) type 1 subunit sheds light on the activation process of GABA(B) receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52) :41166–41174. [cité page 68]

Geiser, M., Cebe, R., Drewello, D., and Schmitz, R. (2001). Integration of PCR fragments at any specific site within cloning vectors without the use of restriction enzymes and DNA ligase. *Biotechniques*, 31(1) :88–+. [cité page 261]

Gerstein, M., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1994). Structural mechanisms for domain movements in proteins. *Biochemistry*, 33(22) :6739–49. [cité page 67]

Gielen, M. (2010). [Molecular operation of ionotropic glutamate receptors : proteins that mediate the excitatory synaptic neurotransmission.]. *Med Sci (Paris)*, 1(26) :65–72. [cité page 22]

Gielen, M., Le Goff, A., Stroebel, D., Johnson, J. W., Neyton, J., and Paoletti, P. (2008). Structural rearrangements of NR1/NR2A NMDA receptors during allosteric inhibition. *Neuron*, 57(1) :80–93. [cité pages 55, 57, 58, 60, 99, 106, 115, 126, 256, 261, 276, 304, 305, 307, 317 et 320]

Gielen, M., Siegler Retchless, B., Mony, L., Johnson, J. W., and Paoletti, P. (2009). Mechanism of differential control of NMDA receptor activity by NR2 subunits. *Nature*, 459(7247) :703–7. [cité pages 38, 49, 58, 59, 60, 69, 96, 99, 116, 203, 208, 256, 261, 268, 276, 279, 282, 283, 288, 301, 304, 305, 306, 307 et 320]

Gill, R., Alanine, A., Bourson, A., Buttelmann, B., Fischer, G., Heitz, M. P., Kew, J. N., Levet-Trafit, B., Lorez, H. P., Malherbe, P., Miss, M. T., Mutel, V., Pinard, E., Roever, S., Schmitt, M., Trube, G., Wybrecht, R., Wyler, R., and Kemp, J. A. (2002). Pharmacological characterization of Ro 63-1908 (1-[2-(4-hydroxy-phenoxy)-ethyl]-4-(4-methyl-benzyl)-piperidin-4-ol), a novel subtype-selective N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 302(3) :940–8. [cité page 138]

Gitto, R., De Luca, L., Ferro, S., Occhiuto, F., Samperi, S., De Sarro, G., Russo, E., Ciranna, L., Costa, L., and Chimirri, A. (2008). Computational studies to discover a new NR2B/NMDA receptor antagonist and evaluation of pharmacological profile. *ChemMedChem*, 3(10) :1539–48. [cité pages 222, 244, 245 et 246]

Glaser, F., Pupko, T., Paz, I., Bell, R. E., Bechor-Shental, D., Martz, E., and Ben-Tal, N. (2003). ConSurf : identification of functional regions in proteins by surface-mapping of phylogenetic information. *Bioinformatics*, 19(1) :163–4. [cité pages 78 et 91]

Gogas, K. R. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches : NR2B receptor antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, 6(1) :68–74. [cité page 231]

Good, A. C., Krystek, S. R., and Mason, J. S. (2000). High-throughput and virtual screening : core lead discovery technologies move towards integration. *Drug Discovery Today*, 5(12) :S61–S69. [cité page 217]

Greger, I. H., Ziff, E. B., and Penn, A. C. (2007). Molecular determinants of AMPA receptor subunit assembly. *Trends in Neurosciences*, 30(8) :407–416. [cité page 30]

Gregory, T. F., Wright, J. L., Wise, L. D., Meltzer, L. T., Serpa, K. A., Konkoy, C. S., Whittemore, E. R., and Woodward, R. M. (2000). Parallel synthesis of a series of subtype-selective NMDA receptor antagonists. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 10(6) :527–529. [cité page 241]

Guscott, M. R., Clarke, H. F., Murray, F., Grimwood, S., Bristow, L. J., and Hutson, P. H. (2003). The effect of (+/-)-CP-101,606, an NMDA receptor NR2B subunit selective antagonist, in the Morris watermaze. *Eur J Pharmacol*, 476(3) :193–9. [cité page 138]

Hamilton, N. B. and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters ? *Nat Rev Neurosci*, 11(4) :227–38. [cité page 37]

Han, X., Tomitori, H., Mizuno, S., Higashi, K., Full, C., Fukiwake, T., Terui, Y., Leewanich, P., Nishimura, K., Toida, T., Williams, K., Kashiwagi, K., and Igarashi, K. (2008). Binding of spermine and ifenprodil to a purified, soluble regulatory domain of the N-methyl-D-aspartate receptor. *J Neurochem*, 107(6) :1566–77. [cité pages 113, 115, 120, 122, 151, 209, 211, 255, 265 et 300]

Hansen, K. B., Yuan, H., and Traynelis, S. F. (2007). Structural aspects of AMPA receptor activation, desensitization and deactivation. *Curr Opin Neurobiol*, 17(3) :281–8. [cité pages 51, 52 et 53]

Hardingham, G. E. and Bading, H. (2003). The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*, 26(2) :81–9. [cité pages 129, 130 et 131]

Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002). Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways. *Nat Neurosci*, 5(5) :405–14. [cité pages 131 et 132]

Harman, R. J. and Shaw, G. G. (1981a). High-affinity uptake of spermine by slices of rat cerebral cortex. *J Neurochem*, 36(5) :1609–15. [cité page 123]

Harman, R. J. and Shaw, G. G. (1981b). The spontaneous and evoked release of spermine from rat brain in vitro. *Br J Pharmacol*, 73(1) :165–74. [cité page 123]

Hatton, C. J. and Paoletti, P. (2005). Modulation of triheteromeric NMDA receptors by N-terminal domain ligands. *Neuron*, 46(2) :261–74. [cité pages 33 et 112]

He, X.-L., Chow, D.-C., Martick, M. M., and Garcia, K. C. (2001). Allosteric Activation of a Spring-Loaded Natriuretic Peptide Receptor Dimer by Hormone. *Science*, 293 :1657–1662. [cité pages 65, 76, 84, 85 et 302]

Herin, G. A. and Aizenman, E. (2004). Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function. *Eur J Pharmacol*, 500(1-3) :101–11. [cité page 42]

Hollmann, M., O'Shea-Greenfield, A., Rogers, S. W., and Heinemann, S. (1989). Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*, 342(6250) :643–8. [cité page 26]

Horak, M., Vlcek, K., Chodounska, H., and Vyklicky, L. (2006). Subtype-dependence of N-methyl-D-aspartate receptor modulation by pregnenolone sulfate. *Neuroscience*, 137(1) :93–102. [cité page 125]

Horak, M., Vlcek, K., Petrovic, M., Chodounska, H., and Vyklicky, L. (2004). Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *Journal of Neuroscience*, 24(46) :10318–10325. [cité pages 125 et 126]

Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., and Smart, T. G. (2006). Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature*, 444(7118) :486–9. [cité page 126]

Huggins, D. J. and Grant, G. H. (2005). The function of the amino terminal domain in NMDA receptor modulation. *J Mol Graph Model*, 23(4) :381–8. [cité pages 122, 255, 265, 270 et 300]

Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991). Identification of a Site in Glutamate Receptor Subunits That Controls Calcium Permeability. *Science*, 253(5023) :1028–1031. [cité page 29]

Igarashi, K. and Kashiwagi, K. (2010). Modulation of cellular function by polyamines. *Int J Biochem Cell Biol*, 42(1) :39–51. [cité pages 116, 117, 118 et 254]

Ihle, E. C. and Patneau, D. K. (2000). Modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor desensitization by extracellular protons. *Molecular Pharmacology*, 58(6) :1204–1212. [cité page 106]

Inanobe, A., Furukawa, H., and Gouaux, E. (2005). Mechanism of partial agonist action at the NR1 subunit of NMDA receptors. *Neuron*, 47(1) :71–84. [cité pages 50 et 54]

Jang, M. K., Mierke, D. F., Russek, S. J., and Farb, D. H. (2004). A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21) :8198–8203. [cité pages 125 et 126]

Jensen, A. A., Sheppard, P. O., Jensen, L. B., O'Hara, P. J., and Brauner-Osborne, H. (2001). Construction of a high affinity zinc binding site in the metabotropic glutamate receptor mGluR1 : noncompetitive antagonism originating from the amino-terminal domain of a family C G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 276(13) :10110–8. [cité page 81]

Jin, R., Banke, T. G., Mayer, M. L., Traynelis, S. F., and Gouaux, E. (2003). Structural basis for partial agonist action at ionotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci*, 6(8) :803–10. [cité pages 52 et 54]

Jin, R., Singh, S. K., Gu, S., Furukawa, H., Sobolevsky, A. I., Zhou, J., Jin, Y., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure and association behaviour of the GluR2 amino-terminal domain. *Embo J*, 28(12) :1812–23. [cité pages 40, 42, 48, 77, 87, 90, 94, 95, 115, 195, 210, 212, 269, 271, 303, 317, 318 et 321]

Jin, R. S., Clark, S., Weeks, A. M., Dudman, J. T., Gouaux, E., and Partin, K. M. (2005). Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors. *Journal of Neuroscience*, 25(39) :9027–9036. [cité pages 55, 57, 315 et 317]

Jingami, H., Nakanishi, S., and Morikawa, K. (2003). Structure of the metabotropic glutamate receptor. *Current Opinion in Neurobiology*, 13(3) :271–278. [cité page 81]

Johnson, J. W. and Ascher, P. (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325(6104) :529–31. [cité page 38]

Johnson, J. W. and Kotermanski, S. E. (2006). Mechanism of action of memantine. *Curr Opin Pharmacol*, 6(1) :61–7. [cité page 136]

Kalev-Zylinska, M. L., Symes, W., Young, D., and During, M. J. (2009). Knockdown and overexpression of NR1 modulates NMDA receptor function. *Mol Cell Neurosci*, 41(4) :383–96. [cité page 129]

Karadottir, R., Cavelier, P., Bergersen, L. H., and Attwell, D. (2005). NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia. *Nature*, 438(7071) :1162–1166. [cité pages 35, 144 et 145]

Karakas, E., Simorowski, N., and Furukawa, H. (2009). Structure of the zinc-bound amino-terminal domain of the NMDA receptor NR2B subunit. *Embo J*, 28(24) :3910–20. [cité pages 40, 42, 49, 87, 93, 96, 97, 98, 99, 109, 110, 195, 197, 199, 202, 203, 204, 205, 206, 208, 210, 238, 240, 250, 269, 271, 283, 303 et 320]

Kashiwagi, K., Fukuchi, J., Chao, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1996a). An aspartate residue in the extracellular loop of the N-methyl-D-aspartate receptor controls sensitivity to spermine and protons. *Mol Pharmacol*, 49(6) :1131–41. [cité pages 122, 255, 265 et 268]

Kashiwagi, K., Pahk, A. J., Masuko, T., Igarashi, K., and Williams, K. (1997). Block and modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by polyamines and protons : role of amino acid residues in the transmembrane and pore-forming regions of NR1 and NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, 52(4) :701–13. [cité pages 119 et 265]

Kashiwagi, K., Pistocchi, R., Shibuya, S., Sugiyama, S., Morikawa, K., and Igarashi, K. (1996b). Spermidine-preferential uptake system in Escherichia coli. Identification of amino acids involved in polyamine binding in PotD protein. *J Biol Chem*, 271(21) :12205–8. [cité pages 122 et 255]

Kemp, J. A. and McKernan, R. M. (2002). NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*, 5 Suppl :1039–42. [cité pages 130, 135, 136, 138, 151, 215 et 231]

Kew, J. N. and Kemp, J. A. (1998). An allosteric interaction between the NMDA receptor polyamine and ifenprodil sites in rat cultured cortical neurones. *J Physiol*, 512 (Pt 1) :17–28. [cité pages 121, 123, 256 et 268]

Kew, J. N. and Kemp, J. A. (2005). Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl)*, 179(1) :4–29. [cité pages 133, 136, 141, 151, 215 et 231]

Kew, J. N., Trube, G., and Kemp, J. A. (1996). A novel mechanism of activity-dependent NMDA receptor antagonism describes the effect of ifenprodil in rat cultured cortical neurones. *J Physiol*, 497 (Pt 3) :761–72. [cité pages 112 et 139]

Kew, J. N. C., Trube, G., and Kemp, J. A. (1998). State-dependent NMDA receptor antagonism by Ro 8-4304, a novel NR2B selective, non-competitive, voltage-independent antagonist. *British Journal of Pharmacology*, 123(3) :463–472. [cité page 139]

Kiss, L., Cheng, G., Bednar, B., Bednar, R. A., Bennett, P. B., Kane, S. A., McIntyre, C. J., McCauley, J. A., and Koblan, K. S. (2005). In vitro characterization of novel NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Neurochem Int*, 46(6) :453–64. [cité pages 209 et 245]

Kniazeff, J., Bessis, A. S., Maurel, D., Ansanay, H., Prezeau, L., and Pin, J. P. (2004a). Closed state of both binding domains of homodimeric mGlu receptors is required for full activity. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(8) :706–713. [cité pages 83 et 309]

Kniazeff, J., Saintot, P. P., Goudet, C., Liu, J. F., Charnet, A., Guillon, G., and Pin, J. P. (2004b). Locking the dimeric GABA(B) G-protein-coupled receptor in its active state. *Journal of Neuroscience*, 24(2) :370–377. [cité pages 68, 83 et 309]

Kohr, G. (2006). NMDA receptor function : subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res*, 326(2) :439–46. [cité pages 37 et 130]

Kornberg, B. E., Nikam, S. S., Wright, J. L., Kesten, S. R., Meltzer, L. T., Coughenour, L., Barr, B., Serpa, K. A., and McCormick, J. (2004). Subtype selective NMDA receptor antagonists : evaluation of some novel alkynyl analogues. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14(5) :1213–1216. [cité pages 233 et 241]

Kotermanski, S. E. and Johnson, J. W. (2009). Mg2+ imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine. *J Neurosci*, 29(9) :2774–9. [cité page 138]

Kreimeyer, A., Laube, B., Sturgess, M., Goeldner, M., and Foucaud, B. (1999). Evaluation and biological properties of reactive ligands for the mapping of the glycine site on the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *J Med Chem*, 42(21) :4394–404. [cité page 155]

Krueger, B. A., Weil, T., and Schneider, G. (2009). Comparative virtual screening and novelty detection for NMDA-GlycineB antagonists. *J Comput Aided Mol Des*, 23(12) :869–81. [cité page 244]

Kubo, Y. and Tateyama, M. (2005). Towards a view of functioning dimeric metabotropic receptors. *Curr Opin Neurobiol*, 15(3) :289–95. [cité page 83]

Kumar, J., Schuck, P., Jin, R., and Mayer, M. L. (2009). The N-terminal domain of GluR6-subtype glutamate receptor ion channels. *Nat Struct Mol Biol*, 16(6) :631–8. [cité pages 40, 42, 48, 76, 87, 90, 92, 95, 115, 195, 210, 212, 269, 303, 317, 318 et 321]

Kunishima, N., Shimada, Y., Tsuji, Y., Sato, T., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Nakashimi, S., Jingami, H., and Morikawa, K. (2000). Structural basis of glutamate recognition by a dimeric metabotropic glutamate receptor. *Nature*, 407 :971–977. [cité pages 24, 26, 65, 67, 71, 72, 79, 277, 302 et 305]

Kurogi, Y. and Guner, O. F. (2001). Pharmacophore modeling and three-dimensional database searching for drug design using catalyst. *Curr Med Chem*, 8(9) :1035–55. [cité pages 222 et 244]

Lau, C. G. and Zukin, R. S. (2007). NMDA receptor trafficking in synaptic plasticity and neuropsychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(6) :413–426. [cité pages 34 et 44]

Layton, M. E., Kelly, M. J., and Rodzinak, K. J. (2006). Recent advances in the development of NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 6(7) :697–709. [cité pages 215 et 232]

Lee, J. M., Zipfel, G. J., and Choi, D. W. (1999). The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399(6738) :A7–A14. [cité pages 130, 135 et 136]

Legendre, P. and Westbrook, G. L. (1991). Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism. *Mol Pharmacol*, 40(2) :289–98. [cité page 139]

Lei, S. B., Orser, B. A., Thatcher, G. R. L., Reynolds, J. N., and MacDonald, J. F. (2001). Positive allosteric modulators of AMPA receptors reduce proton-induced receptor desensitization in rat hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 85(5) :2030–2038. [cité page 106]

Lerma, J. (2003). Roles and rules of kainate receptors in synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(6) :481–495. [cité page 31]

Lerma, J. (2006). Kainate receptor physiology. *Curr Opin Pharmacol*, 6(1) :89–97. [cité page 31]

Lewis, D. A. and Lieberman, J. A. (2000). Catching up on schizophrenia : Natural history and neurobiology. *Neuron*, 28(2) :325–334. [cité page 143]

Li, H., Sutter, J., and Hoffmann, R. (2000). Hypogen : an automated system for generating 3D predictive pharmacophore models. In GÃ$\frac{1}{4}$ner, O. F., editor, *Pharmacophore perception, development and use in drug design*, pages 171–189. La Jolla, IUL Biotechnology Series, La Jolla. [cité page 233]

Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyakkers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M., and Wang, Y. T. (2007). NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci*, 27(11) :2846–57. [cité pages 131 et 132]

Lopez de Armentia, M. and Sah, P. (2003). Development and subunit composition of synaptic NMDA receptors in the amygdala : NR2B synapses in the adult central amygdala. *J Neurosci*, 23(17) :6876–83. [cité page 37]

Low, C. M., Lyuboslavsky, P., French, A., Le, P., Wyatte, K., Thiel, W. H., Marchan, E. M., Igarashi, K., Kashiwagi, K., Gernert, K., Williams, K., Traynelis, S. F., and Zheng, F. (2003). Molecular determinants of proton-sensitive N-methyl-D-aspartate receptor gating. *Mol Pharmacol*, 63(6) :1212–22. [cité pages 103, 104, 105, 107, 108 et 307]

Low, C. M., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., and Traynelis, S. F. (2000). Molecular determinants of coordinated proton and zinc inhibition of N-methyl-D-aspartate NR1/NR2A receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(20) :11062–7. [cité pages 57, 104, 107, 108, 115, 116, 263 et 311]

Luo, J., Wang, Y., Yasuda, R. P., Dunah, A. W., and Wolfe, B. B. (1997). The majority of N-methyl-D-aspartate receptor complexes in adult rat cerebral cortex contain at least three different subunits (NR1/NR2A/NR2B). *Mol Pharmacol*, 51(1) :79–86. [cité page 33]

Luu, P., Acher, F., Bertrand, H. O., Fan, J. H., and Ngai, J. (2004). Molecular determinants of ligand selectivity in a vertebrate odorant receptor. *Journal of Neuroscience*, 24(45) :10128–10137. [cité page 76]

Léveillé, F., El Gaamouch, F., Gouix, E., Lecocq, M., Lobner, D., Nicole, O., and Buisson, A. (2008). Neuronal viability is controlled by a functional relation between synaptic and extrasynaptic NMDA receptors. *Faseb J*, 22(12) :4258–71. [cité pages 131 et 138]

Magnusson, U., Salopek-Sondi, B., Luck, L. A., and Mowbray, S. L. (2004). X-ray structures of the leucine-binding protein illustrate conformational changes and the basis of ligand specificity. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10) :8747–8752. [cité page 67]

Makani, S. and Chesler, M. (2007). Endogenous alkaline transients boost postsynaptic NMDA receptor responses in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 27(28) :7438–46. [cité page 104]

Malayev, A., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (2002). Inhibition of the NMDA response by pregnenolone sulphate reveals subtype selective modulation of NMDA receptors by sulphated steroids. *British Journal of Pharmacology*, 135(4) :901–909. [cité pages 125 et 126]

Malenka, R. C. and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD : An embarrassment of riches. *Neuron*, 44(1) :5–21. [cité pages 39 et 129]

Malherbe, P., Mutel, V., Broger, C., Perin-Dureau, F., Kemp, J. A., Neyton, J., Paoletti, P., and Kew, J. N. C. (2003). Identification of critical residues in the amino terminal domain of the human NR2B subunit involved in the RO 25-6981 binding pocket. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 307(3) :897–905. [cité pages 87, 109, 152, 231, 232 et 245]

Manly, C. J., Louise-May, S., and Hammer, J. D. (2001). The impact of informatics and computational chemistry on synthesis and screening. *Drug Discovery Today*, 6(21) :1101–1110. [cité pages 216 et 244]

Marinelli, L., Cosconati, S., Steinbrecher, T., Limongelli, V., Bertamino, A., Novellino, E., and Case, D. A. (2007). Homology modeling of NR2B modulatory domain of NMDA receptor and analysis of ifenprodil binding. *ChemMedChem*, 2(10) :1498–510. [cité page 152]

Martel, M. A., Wyllie, D. J., and Hardingham, G. E. (2009). In developing hippocampal neurons, NR2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors (NMDARs) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation, as well as neuronal death. *Neuroscience*, 158 :334–343. [cité page 132]

Marvin, J. S. and Hellinga, H. W. (2001). Manipulation of ligand binding affinity by exploitation of conformational coupling. *Nature Structural Biology*, 8(9) :795–798. [cité page 69]

Masuko, T., Kashiwagi, K., Kuno, T., Nguyen, N. D., Pahk, A. J., Fukuchi, J., Igarashi, K., and Williams, K. (1999). A regulatory domain (R1-R2) in the amino terminus of the N-methyl-D-aspartate receptor : effects of spermine, protons, and ifenprodil, and structural similarity to bacterial leucine/isoleucine/valine binding protein. *Mol Pharmacol*, 55(6) :957–69. [cité pages 104, 113, 122, 152, 211, 255, 265, 269, 271, 300, 301 et 306]

Matsuda, K., Kamiya, Y., Matsuda, S., and Yuzaki, M. (2002). Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B : a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Molecular Brain Research*, 100(1-2) :43–52. [cité page 33]

Mayer, M. L. (2005). Crystal structures of the GluR5 and GluR6 ligand binding cores : molecular mechanisms underlying kainate receptor selectivity. *Neuron*, 45(4) :539–52. [cité pages 43, 51, 52, 54 et 152]

Mayer, M. L. (2006). Glutamate receptors at atomic resolution. *Nature*, 440(7083) :456–62. [cité pages 40, 51, 276, 304 et 305]

Mayer, M. L. and Armstrong, N. (2004). Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*, 66 :161–81. [cité page 40]

Mayer, M. L., Westbrook, G. L., and Guthrie, P. B. (1984). Voltage-dependent block by Mg2+ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309(5965) :261–3. [cité page 38]

McCauley, J. A. (2005). NR2B subtype-selective NMDA receptor antagonists : 2001-2004. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 15(4) :389–407. [cité pages 215, 232 et 245]

McCauley, J. A., Theberge, C. R., Romano, J. J., Billings, S. B., Anderson, K. D., Claremon, D. A., Freidinger, R. M., Bednar, R. A., Mosser, S. D., Gaul, S. L., Connolly, T. M., Condra, C. L., Xia, M. H., Cunningham, M. E., Bednar, B., Stump, G. L., Lynch, J. J., Macaulay, A., Wafford, K. A., Koblan, K. S., and Liverton, N. J. (2004). NR2B-selective N-methyl-D-aspartate antagonists : Synthesis and evaluation of 5-substituted benzimidazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47(8) :2089–2096. [cité page 245]

McGurk, J. F., Bennett, M. V., and Zukin, R. S. (1990). Polyamines potentiate responses of N-methyl-D-aspartate receptors expressed in xenopus oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24) :9971–4. [cité pages 119, 120 et 254]

Meddows, E., Le Bourdelles, B., Grimwood, S., Wafford, K., Sandhu, S., Whiting, P., and McIlhinney, R. A. J. (2001). Identification of molecular determinants that are important in the assembly of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(22) :18795–18803. [cité pages 42, 50 et 274]

Menuz, K., Stroud, R. M., Nicoll, R. A., and Hays, F. A. (2007). TARP auxiliary subunits switch AMPA receptor antagonists into partial agonists. *Science*, 318(5851) :815–7. [cité page 321]

Micu, I., Jiang, Q., Coderre, E., Ridsdale, A., Zhang, L., Woulfe, J., Yin, X., Trapp, B. D., McRory, J. E., Rehak, R., Zamponi, G. W., Wang, W., and Stys, P. K. (2006). NMDA receptors mediate calcium accumulation in myelin during chemical ischaemia. *Nature*, 439(7079) :988–992. [cité pages 35, 144 et 145]

Moghaddam, B. (2003). Bringing order to the glutamate chaos in schizophrenia. *Neuron*, 40(5) :881–4. [cité page 143]

Mohn, A. R., Gainetdinov, R. R., Caron, M. G., and Koller, B. H. (1999). Mice with reduced NMDA receptor expression display behaviors related to schizophrenia. *Cell*, 98(4) :427–36. [cité page 143]

Mony, L., Kew, J. N., Gunthorpe, M. J., and Paoletti, P. (2009a). Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors : molecular mechanisms and therapeutic potential. *Br J Pharmacol*, 157(8) :1301–17. [cité pages 96, 101, 102, 140, 141, 142, 144, 215, 231 et 255]

Mony, L., Krzaczkowski, L., Leonetti, M., Le Goff, A., Alarcon, K., Neyton, J., Bertrand, H. O., Acher, F., and Paoletti, P. (2009b). Structural Basis of NR2B-Selective Antagonist Recognition by N-Methyl-D-aspartate Receptors. *Molecular Pharmacology*, 75(1) :60–74. [cité pages 8, 87, 109, 113, 197, 201, 204, 207, 218, 220, 231, 233, 236, 238, 240, 249, 250, 269 et 283]

Monyer, H., Burnashev, N., Laurie, D. J., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1994). Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*, 12(3) :529–40. [cité pages 34, 39 et 142]

Mori, H., Masaki, H., Yamakura, T., and Mishina, M. (1992). Identification by Mutagenesis of a Mg2+-Block Site of the Nmda Receptor Channel. *Nature*, 358(6388) :673–675. [cité page 44]

Mott, D. D., Doherty, J. J., Zhang, S., Washburn, M. S., Fendley, M. J., Lyuboslavsky, P., Traynelis, S. F., and Dingledine, R. (1998). Phenylethanolamines inhibit NMDA receptors by enhancing proton inhibition. *Nat Neurosci*, 1(8) :659–67. [cité pages 107, 116, 141 et 208]

Mott, D. D., Washburn, M. S., Zhang, S., and Dingledine, R. J. (2003). Subunit-dependent modulation of kainate receptors by extracellular protons and polyamines. *J Neurosci*, 23(4) :1179–88. [cité page 121]

Mu, Y. Y., Otsuka, T., Horton, A. C., Scott, D. B., and Ehlers, M. D. (2003). Activity-dependent mRNA splicing controls ER export and synaptic delivery of NMDA receptors. *Neuron*, 40(3) :581–594. [cité page 34]

Muir, K. W. (2006). Glutamate-based therapeutic approaches : clinical trials with NMDA antagonists. *Curr Opin Pharmacol*, 6(1) :53–60. [cité pages 135, 136, 138 et 215]

Mulle, C., Sailer, A., Perez-Otano, I., Dickinson-Anson, H., Castillo, P. E., Bureau, I., Maron, C., Gage, F. H., Mann, J. R., Bettler, B., and Heinemann, S. F. (1998). Altered synaptic physiology and reduced susceptibility to kainate-induced seizures in GluR6-deficient mice. *Nature*, 392(6676) :601–605. [cité page 31]

Muto, T., Tsuchiya, D., Morikawa, K., and Jingami, H. (2007). Structures of the extracellular regions of the group II/III metabotropic glutamate receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10) :3759–64. [cité pages 24, 79 et 83]

Nakagawa, T., Cheng, Y., Ramm, E., Sheng, M., and Walz, T. (2005). Structure and different conformational states of native AMPA receptor complexes. *Nature*, 433(7025) :545–9. [cité page 45]

Nakagawa, T., Cheng, Y., Sheng, M., and Walz, T. (2006). Three-dimensional structure of an AMPA receptor without associated stargazin/TARP proteins. *Biol Chem*, 387(2) :179–87. [cité page 45]

Newcomer, M. E., Lewis, B. A., and Quiocho, F. A. (1981). The radius of gyration of L-arabinose-binding protein decreases upon binding of ligand. *J Biol Chem*, 256(24) :13218–22. [cité page 68]

Neyton, J. and Paoletti, P. (2006). Relating NMDA receptor function to receptor subunit composition : limitations of the pharmacological approach. *J Neurosci*, 26(5) :1331–3. [cité pages 111, 112, 132 et 135]

Ng, D., Pitcher, G. M., Szilard, R. K., Sertie, A., Kanisek, M., Clapcote, S. J., Lipina, T., Kalia, L. V., Joo, D., McKerlie, C., Cortez, M., Roder, J. C., Salter, M. W., and McInnes, R. R. (2009). Neto1 is a novel CUB-domain NMDA receptor-interacting protein required for synaptic plasticity and learning. *PLoS Biol*, 7(2) :e41. [cité page 321]

Ng, F. M., Geballe, M. T., Snyder, J. P., Traynelis, S. F., and Low, C. M. (2008). Structural insights into phenylethanolamines high-affinity binding site in NR2B from binding and molecular modeling studies. *Mol Brain*, 1(1) :16. [cité pages 113, 151 et 152]

Ng, F. M., Soh, W., Geballe, M. T., and Low, C. M. (2007). Improving solubility of NR2B amino-terminal domain of N-methyl-d-aspartate receptor expressed in Escherichia coli. *Biochem Biophys Res Commun*, 362(1) :69–74. [cité page 113]

Nikam, S. S. and Meltzer, L. T. (2002). NR2B selective NMDA receptor antagonists. *Current Pharmaceutical Design*, 8(10) :845–855. [cité pages 215, 232 et 238]

Nishi, M., Hinds, H., Lu, H. P., Kawata, M., and Hayashi, Y. (2001). Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *Journal of Neuroscience*, 21(23) :art. no.–RC185. [cité pages 27, 33 et 35]

Niswender, C. M. and Conn, P. J. (2010). Metabotropic glutamate receptors : physiology, pharmacology, and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50 :295–322. [cité pages 23 et 24]

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium Gates Glutamate-Activated Channels in Mouse Central Neurons. *Nature*, 307(5950) :462–465. [cité page 38]

Ogawa, H., Qiu, Y., Ogata, C. M., and Misono, K. S. (2004). Crystal structure of hormone-bound atrial natriuretic peptide receptor extracellular domain : rotation mechanism for transmembrane signal transduction. *J Biol Chem*, 279(27) :28625–31. [cité page 86]

O'Hara, P. J., Sheppard, P. O., Thogersen, H., Venezia, D., Haldeman, B. A., McGrane, V., Houamed, K. M., Thomsen, C., Gilbert, T. L., and Mulvihill, E. R. (1993). The Ligand-Binding Domain in Metabotropic Glutamate Receptors Is Related to Bacterial Periplasmic Binding-Proteins. *Neuron*, 11(1) :41–52. [cité pages 24, 40, 65, 96, 152, 301 et 302]

Olney, J. W. (1969). Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science*, 164(880) :719–21. [cité page 129]

Pahk, A. J. and Williams, K. (1997). Influence of extracellular pH on inhibition by ifenprodil at N-methyl-D-aspartate receptors in Xenopus oocytes. *Neurosci Lett*, 225(1) :29–32. [cité pages 107, 116, 141 et 208]

Paoletti, P., Ascher, P., and Neyton, J. (1997). High-affinity zinc inhibition of NMDA NR1-NR2A receptors. *J Neurosci*, 17(15) :5711–25. [cité pages 34, 108, 261 et 292]

Paoletti, P. and Neyton, J. (2007). NMDA receptor subunits : function and pharmacology. *Curr Opin Pharmacol*, 7(1) :39–47. [cité pages 33, 103, 112, 132, 133, 135 et 231]

Paoletti, P., Neyton, J., and Ascher, P. (1995). Glycine-independent and subunit-specific potentiation of NMDA responses by extracellular Mg2+. *Neuron*, 15(5) :1109–20. [cité pages 120, 123 et 317]

Paoletti, P., Perin-Dureau, F., Fayyazuddin, A., Goff, A. L., Callebaut, I., and Neyton, J. (2000). Molecular Organization of a Zinc Binding N-Terminal Modulatory Domain in a NMDA Receptor Subunit. *Neuron*, 28 :911–925. [cité pages 40, 42, 57, 65, 68, 69, 87, 96, 108, 110, 134, 152 et 301]

Paoletti, P., Vergnano, A. M., Barbour, B., and Casado, M. (2009). Zinc at glutamatergic synapses. *Neuroscience*, 158(1) :126–36. [cité page 112]

Papadakis, M., Hawkins, L. M., and Stephenson, F. A. (2004). Appropriate NR1-NR1 disulfide-linked homodimer formation is requisite for efficient expression of functional, cell surface N-methyl-D-aspartate NR1/NR2 receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15) :14703–14712. [cité pages 42 et 274]

Papadia, S. and Hardingham, G. E. (2007). The dichotomy of NMDA receptor signaling. *Neuroscientist*, 13(6) :572–9. [cité pages 129, 130, 131 et 136]

Park, C. K., Nehls, D. G., Graham, D. I., Teasdale, G. M., and McCulloch, J. (1988). The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol*, 24(4) :543–51. [cité page 135]

Park-Chung, M., Wu, F. S., Purdy, R. H., Malayev, A. A., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (1997). Distinct sites for inverse modulation of N-methyl-D-aspartate receptors by sulfated steroids. *Molecular Pharmacology*, 52(6) :1113–1123. [cité pages 125, 126 et 127]

Park-Chung, M. J., Wu, F. S., and Farb, D. H. (1994). 3-Alpha-Hydroxy-5-Beta-Pregnan-20-One Sulfate - a Negative Modulator of the Nmda-Induced Current in Cultured Neurons. *Molecular Pharmacology*, 46(1) :146–150. [cité page 126]

Parmentier, M. L., Prezeau, L., Bockaert, J., and Pin, J. P. (2002). A model for the functioning of family 3 GPCRs. *Trends Pharmacol Sci*, 23(6) :268–74. [cité pages 69 et 71]

Pasternack, A., Coleman, S. K., Jouppila, A., Mottershead, D. G., Lindfors, M., Pasternack, M., and Keinanen, K. (2002). alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptor channels lacking the N-terminal domain. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51) :49662–49667. [cité page 51]

Perin-Dureau, F., Rachline, J., Neyton, J., and Paoletti, P. (2002). Mapping the Binding Site of the Neuroprotectant Ifenprodil on NMDA Receptors. *The Journal of Neuroscience*, 22(14) :5955–5965. [cité pages 42, 57, 109, 113, 114, 139, 151, 152, 153, 198, 204, 231, 232, 240, 241 et 252]

Peters, S., Koh, J., and Choi, D. W. (1987). Zinc Selectively Blocks the Action of N-Methyl-D-Aspartate on Cortical-Neurons. *Science*, 236(4801) :589–593. [cité page 108]

Petrovic, M., Sedlacek, M., Horak, M., Chodounska, H., and Vyklicky, L. (2005). 20-Oxo-5 beta-pregnan-3 alpha-yl sulfate is a use-dependent NMDA receptor inhibitor. *Journal of Neuroscience*, 25(37) :8439–8450. [cité pages 126 et 127]

Pin, J. P., Galvez, T., and Prezeau, L. (2003). Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors. *Pharmacology and Therapeutics*, 98(3) :325–354. [cité pages 23, 24, 65, 71, 76 et 83]

Pin, J. P., Kniazeff, J., Liu, J., Binet, V., Goudet, C., Rondard, P., and Prezeau, L. (2005). Allosteric functioning of dimeric class C G-protein-coupled receptors. *Febs Journal*, 272(12) :2947–2955. [cité page 26]

Pinheiro, P. S. and Mulle, C. (2008). Presynaptic glutamate receptors : physiological functions and mechanisms of action. *Nat Rev Neurosci*, 9(6) :423–36. [cité pages 23, 28 et 37]

Qiu, S., Zhang, X. M., Cao, J. Y., Yang, W., Yan, Y. G., Shan, L., Zheng, J., and Luo, J. H. (2009). An endoplasmic reticulum retention signal located in the extracellular amino-terminal domain of the NR2A subunit of N-Methyl-D-aspartate receptors. *J Biol Chem*, 284(30) :20285–98. [cité pages 266 et 267]

Qu, X. X., Cai, J., Li, M. J., Chi, Y. N., Liao, F. F., Liu, F. Y., Wan, Y., Han, J. S., and Xing, G. G. (2009). Role of the spinal cord NR2B-containing NMDA receptors in the development of neuropathic pain. *Exp Neurol*, 215(2) :298–307. [cité page 142]

Quiocho, F. A. and Ledvina, P. S. (1996). Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis : Variation of common themes. *Molecular Microbiology*, 20(1) :17–25. [cité pages 42, 64 et 71]

Rachline, J., Perin-Dureau, F., Goff, A. L., Neyton, J., and Paoletti, P. (2005). The micromolar Zinc-Binding Domain on the NMDA Receptor Subunit NR2B. *The Journal of Neuroscience*, 25(2) :308–317. [cité pages 42, 57, 96, 108, 109, 113, 134, 153, 154, 155, 198, 237 et 261]

Ransom, R. W. and Stec, N. L. (1988). Cooperative Modulation of [H-3] Mk-801 Binding to the N-Methyl-D-Aspartate Receptor-Ion Channel Complex by L-Glutamate, Glycine, and Polyamines. *Journal of Neurochemistry*, 51(3) :830–836. [cité page 117]

Robel, P. and Baulieu, E. E. (1994). Neurosteroids Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab*, 5(1) :1–8. [cité page 124]

Rock, D. M. and MacDonald, R. L. (1992). Spermine and related polyamines produce a voltage-dependent reduction of N-methyl-D-aspartate receptor single-channel conductance. *Mol Pharmacol*, 42(1) :157–64. [cité pages 119 et 254]

Rock, D. M. and Macdonald, R. L. (1995). Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35 :463–82. [cité pages 116, 117, 118 et 254]

Rondard, P., Huang, S., Monnier, C., Tu, H., Blanchard, B., Oueslati, N., Malhaire, F., Li, Y., Trinquet, E., Labesse, G., Pin, J. P., and Liu, J. (2008). Functioning of the dimeric GABA(B) receptor extracellular domain revealed by glycan wedge scanning. *Embo Journal*, 27(9) :1321–1332. [cité page 77]

Rosemond, E., Wang, M., Yao, Y., Storjohann, L., Stormann, T., Johnson, E. C., and Hampson, D. R. (2004). Molecular basis for the differential agonist affinities of group III metabotropic glutamate receptors. *Mol Pharmacol*, 66(4) :834–42. [cité page 207]

Rost, B. and Sander, C. (1993). Prediction of Protein Secondary Structure at Better than 70Accuracy. *Journal of Molecular Biology*, 232(2) :584–599. [cité page 262]

Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process : Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie-International Edition*, 41(14) :2596–+. [cité page 298]

Rothman, S. M. and Olney, J. W. (1987). Excitotoxicity and the Nmda Receptor. *Trends in Neurosciences*, 10(7) :299–302. [cité page 129]

Rozas, J. L., Paternain, A. V., and Lerma, J. (2003). Noncanonical signaling by ionotropic kainate receptors. *Neuron*, 39(3) :543–53. [cité page 31]

Sack, J. S., Saper, M. A., and Quiocho, F. A. (1989). Periplasmic Binding-Protein Structure and Function - Refined X-Ray Structures of the Leucine Isoleucine Valine-Binding Protein and Its Complex with Leucine. *Journal of Molecular Biology*, 206(1) :171–191. [cité pages 63, 67, 68, 71 et 72]

Saier, M. H. (2000). Families of transmembrane transporters selective for amino acids and their derivatives. *Microbiology-Sgm*, 146 :1775–1795. [cité page 63]

Sakurada, K., Masu, M., and Nakanishi, S. (1993). Alteration of Ca2+ Permeability and Sensitivity to Mg2+ and Channel Blockers by a Single Amino-Acid Substitution in the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1) :410–415. [cité pages 33 et 43]

Salter, M. G. and Fern, R. (2005). NMDA receptors are expressed in developing oligodendrocyte processes and mediate injury. *Nature*, 438(7071) :1167–1171. [cité pages 35, 144 et 145]

Salter, M. W. and Kalia, L. V. (2004). SRC kinases : A hub for NMDA receptor regulation. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(4) :317–328. [cité pages 34 et 44]

Saunders, R., Nahorski, S. R., and Challiss, R. A. J. (1998). A modulatory effect of extracellular Ca2+ on type 1 alpha metabotropic glutamate receptor-mediated signalling. *Neuropharmacology*, 37(2) :273–276. [cité page 83]

Schelkun, R. M., Yuen, P. W., Serpa, K., Meltzer, L. T., Wise, L. D., Whittemore, E. R., and Woodward, R. M. (2000). Subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists : Benzimidazalone and hydantoin as phenol replacements. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(9) :1892–1897. [cité page 241]

Schorge, S. and Colquhoun, D. (2003). Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci*, 23(4) :1151–8. [cité pages 44 et 49]

Shaw, G. G. and Pateman, A. J. (1973). The regional distribution of the polyamines spermidine and spermine in brain. *J Neurochem*, 20(4) :1225–30. [cité page 122]

Sheng, M., Cummings, J., Roldan, L. A., Jan, Y. N., and Jan, L. Y. (1994). Changing Subunit Composition of Heteromeric Nmda Receptors During Development of Rat Cortex. *Nature*, 368(6467) :144–147. [cité page 33]

Smellie, A., Teig, S. L., and Towbin, P. (1995). Poling - Promoting Conformational Variation. *Journal of Computational Chemistry*, 16(2) :171–187. [cité page 233]

Sobolevsky, A. I., Rosconi, M. P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. *Nature*, 462(7274) :745–56. [cité pages 40, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 51, 52, 61, 87, 97, 105, 106, 269, 273 et 302]

Sommer, B., Keinanen, K., Verdoorn, T. A., Wisden, W., Burnashev, N., Herb, A., Kohler, M., Takagi, T., Sakmann, B., and Seeburg, P. H. (1990). Flip and Flop - a Cell-Specific Functional Switch in Glutamate-Operated Channels of the Cns. *Science*, 249(4976) :1580–1585. [cité page 29]

Sommer, B., Kohler, M., Sprengel, R., and Seeburg, P. H. (1991). Rna Editing in Brain Controls a Determinant of Ion Flow in Glutamate-Gated Channels. *Cell*, 67(1) :11–19. [cité page 29]

Soriano, F. X. and Hardingham, G. E. (2007). Compartmentalized NMDA receptor signalling to survival and death. *J Physiol*, 584(Pt 2) :381–7. [cité page 131]

Sternbach, Y., Bettler, B., Hartley, M., Sheppard, P. O., Ohara, P. J., and Heinemann, S. F. (1994). Agonist Selectivity of Glutamate Receptors Is Specified by 2 Domains Structurally Related to Bacterial Amino Acid-Binding Proteins. *Neuron*, 13(6) :1345–1357. [cité pages 42 et 64]

Sucher, N. J., Akbarian, S., Chi, C. L., Leclerc, C. L., Awobuluyi, M., Deitcher, D. L., Wu, M. K., Yuan, J. P., Jones, E. G., and Lipton, S. A. (1995). Developmental and Regional Expression Pattern of a Novel Nmda Receptor-Like Subunit (Nmdar-L) in the Rodent Brain. *Journal of Neuroscience*, 15(10) :6509–6520. [cité page 35]

Sugiyama, S., Matsuo, Y., Maenaka, K., Vassylyev, D. G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Morikawa, K. (1996a). The 1.8-A X-ray structure of the Escherichia coli PotD protein complexed with spermidine and the mechanism of polyamine binding. *Protein Sci*, 5(10) :1984–90. [cité pages 121, 255 et 268]

Sugiyama, S., Vassylyev, D. G., Matsushima, M., Kashiwagi, K., Igarashi, K., and Morikawa, K. (1996b). Crystal structure of PotD, the primary receptor of the polyamine transport system in Escherichia coli. *J Biol Chem*, 271(16) :9519–25. [cité pages 122, 255 et 268]

Sun, Y., Olson, R., Horning, M., Armstrong, N., Mayer, M., and Gouaux, E. (2002). Mechanism of glutamate receptor desensitization. *Nature*, 417(6886) :245–53. [cité pages 52, 55, 57, 257, 315 et 317]

Tahirovic, Y. A., Geballe, M., Gruszecka-Kowalik, E., Myers, S. J., Lyuboslavsky, P., Le, P., French, A., Irier, H., Choi, W. B., Easterling, K., Yuan, H., Wilson, L. J., Kotloski, R., McNamara, J. O., Dingledine, R., Liotta, D. C., Traynelis, S. F., and Snyder, J. P. (2008). Enantiomeric propanolamines as selective N-methyl-D-aspartate 2B receptor antagonists. *J Med Chem*, 51(18) :5506–21. [cité pages 132 et 138]

Takeda, Y., Samejima, K., Nagano, K., Watanabe, M., Sugeta, H., and Kyogoku, Y. (1983). Determination of protonation sites in thermospermine and in some other polyamines by 15N and 13C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Eur J Biochem*, 130(2) :383–9. [cité page 118]

Tamiz, A. P., Whittemore, E. R., Woodward, R. M., Upasani, R. B., and Keana, J. F. W. (1999). Structure-activity relationship for a series of 2-substituted 1,2,3,4-tetrahydro-9H-pyrido 3,4-b indoles : Potent subtype-selective inhibitors of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9(11) :1619–1624. [cité page 241]

Tamiz, A. P., Whittemore, E. R., Zhou, Z. L., Huang, J. C., Drewe, J. A., Chen, J. C., Cai, S. X., Weber, E., Woodward, R. M., and Keana, J. F. W. (1998). Structure-activity relationships for a series of bis(phenylalkyl)amines : Potent subtype-selective inhibitors of N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(18) :3499–3506. [cité pages 221, 232, 233 et 241]

Tang, C. M., Dichter, M., and Morad, M. (1990). Modulation of the N-methyl-D-aspartate channel by extracellular H+. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(16) :6445–9. [cité page 103]

Tang, Y. P., Shimizu, E., Dube, G. R., Rampon, C., Kerchner, G. A., Zhuo, M., Liu, G., and Tsien, J. Z. (1999). Genetic enhancement of learning and memory in mice. *Nature*, 401(6748) :63–9. [cité page 129]

Thomas, C. G., Miller, A. J., and Westbrook, G. L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *Journal of Neurophysiology*, 95(3) :1727–1734. [cité page 37]

Thompson, A. N., Posson, D. J., Parsa, P. V., and Nimigean, C. M. (2008). Molecular mechanism of pH sensing in KcsA potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(19) :6900–5. [cité pages 105 et 106]

Tomita, S., Adesnik, H., Sekiguchi, M., Zhang, W., Wada, K., Howe, J. R., Nicoll, R. A., and Bredt, D. S. (2005). Stargazin modulates AMPA receptor gating and trafficking by distinct domains. *Nature*, 435(7045) :1052–8. [cité page 321]

Tong, G. and Jahr, C. E. (1994). Multivesicular Release from Excitatory Synapses of Cultured Hippocampal-Neurons. *Neuron*, 12(1) :51–59. [cité page 28]

Tong, G., Takahashi, H., Tu, S. C., Shin, Y., Talantova, M., Zago, W., Xia, P., Nie, Z. G., Goetz, T., Zhang, D. X., Lipton, S. A., and Nakanishi, N. (2008). Modulation of NMDA receptor properties and synaptic transmission by the NR3A subunit in mouse hippocampal and cerebrocortical neurons. *Journal of Neurophysiology*, 99(1) :122–132. [cité page 33]

Trakhanov, S., Vyas, N. K., Luecke, H., Kristensen, D. M., Ma, J., and Quiocho, F. A. (2005). Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the Escherichia coli ABC leucine/isoleucine/valine transport system : trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity. *Biochemistry*, 44(17) :6597–608. [cité pages 67, 71 et 72]

Traynelis, S. F., Burgess, M. F., Zheng, F., Lyuboslavsky, P., and Powers, J. L. (1998). Control of voltage-independent zinc inhibition of NMDA receptors by the NR1 subunit. *J Neurosci*, 18(16) :6163–75. [cité pages 34, 104, 107, 108, 116, 121, 255, 309 et 311]

Traynelis, S. F. and Cull-Candy, S. G. (1990). Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons. *Nature*, 345(6273) :347–50. [cité page 103]

Traynelis, S. F., Hartley, M., and Heinemann, S. F. (1995). Control of proton sensitivity of the NMDA receptor by RNA splicing and polyamines. *Science*, 268(5212) :873–6. [cité pages 34, 104, 107, 121, 122, 254, 255, 263, 309, 312, 313 et 315]

Triballeau, N., Acher, F., Brabet, I., Pin, J. P., and Bertrand, H. O. (2005). Virtual screening workflow development guided by the "receiver operating characteristic" curve approach. Application to high-throughput docking on metabotropic glutamate receptor subtype 4. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(7) :2534–2547. [cité pages 217, 225, 234 et 248]

Triballeau, N., Bertrand, H.-O., and Acher, F. (2006). Are you sure you have a good pharmacophore model ? In Langer, T. and Hoffmann, R., editors, *Pharmacophores and pharmacophore searches*, pages 325–363. Wiley-VCH, Weinheim. [cité pages 225, 234, 235, 244, 245 et 248]

Triballeau, N., Van Name, E., Laslier, G., Cai, D., Paillard, G., Sorensen, P. W., Hoffmann, R., Bertrand, H. O., Ngai, J., and Acher, F. C. (2008). High-Potency Olfactory Receptor Agonists Discovered by Virtual High-Throughput Screening : Molecular Probes for Receptor Structure and Olfactory Function. *Neuron*, 60(5) :767–774. [cité pages 231 et 244]

Tsai, G. C. and Coyle, J. T. (2002). Glutamatergic mechanisms in schizophrenia. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 42 :165–179. [cité page 143]

Tsuchiya, D., Kunishima, N., Kamiya, N., Jingami, H., and Morikawa, K. (2002). Structural views of the ligand-binding cores of a metabotropic glutamate receptor complexed with an antagonist and both glutamate and Gd3+. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5) :2660–5. [cité pages 24, 26, 79, 81, 82, 83, 277 et 302]

Ulbrich, M. H. and Isacoff, E. Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(37) :14163–8. [cité page 33]

Verdoorn, T. A., Burnashev, N., Monyer, H., Seeburg, P. H., and Sakmann, B. (1991). Structural Determinants of Ion Flow through Recombinant Glutamate Receptor Channels. *Science*, 252(5013) :1715–1718. [cité page 29]

Vermersch, P. S., Tesmer, J. J., Lemon, D. D., and Quiocho, F. A. (1990). A Pro to Gly mutation in the hinge of the arabinose-binding protein enhances binding and alters specificity. Sugar-binding and crystallographic studies. *J Biol Chem*, 265(27) :16592–603. [cité page 69]

Vicini, S., Wang, J. F., Li, J. H., Zhu, W. J., Wang, Y. H., Luo, J. A. H., Wolfe, B. B., and Grayson, D. R. (1998). Functional and pharmacological differences between recombinant N-methyl-D-aspartate receptors. *Journal of Neurophysiology*, 79(2) :555–566. [cité page 39]

Vicogne, J., Pin, J. P., Lardans, V., Capron, M., Noel, C., and Dissous, C. (2003). An unusual receptor tyrosine kinase of Schistosoma mansoni contains a Venus Flytrap module. *Mol Biochem Parasitol*, 126(1) :51–62. [cité page 65]

Vignes, M. and Collingridge, G. L. (1997). The synaptic activation of kainate receptors. *Nature*, 388(6638) :179–182. [cité page 31]

von Engelhardt, J., Coserea, I., Pawlak, V., Fuchs, E. C., Kohr, G., Seeburg, P. H., and Monyer, H. (2007). Excitotoxicity in vitro by NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors. *Neuropharmacology*, 53(1) :10–17. [cité page 132]

Vyklicky, L., J., Vlachova, V., and Krusek, J. (1990). The effect of external pH changes on responses to excitatory amino acids in mouse hippocampal neurones. *J Physiol*, 430 :497–517. [cité page 103]

Walters, W. P., Stahl, M. T., and Murcko, M. A. (1998). Virtual screening - an overview. *Drug Discovery Today*, 3(4) :160–178. [cité page 217]

Wang, D., Cui, Z., Zeng, Q., Kuang, H., Wang, L. P., Tsien, J. Z., and Cao, X. (2009). Genetic enhancement of memory and long-term potentiation but not CA1 long-term depression in NR2B transgenic rats. *PLoS One*, 4(10) :e7486. [cité page 129]

Wang, L. Y. and MacDonald, J. F. (1995). Modulation by magnesium of the affinity of NMDA receptors for glycine in murine hippocampal neurones. *J Physiol*, 486 (Pt 1) :83–95. [cité page 120]

Watanabe, M., Inoue, Y., Sakimura, K., and Mishina, M. (1993). Distinct distributions of five N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the forebrain. *J Comp Neurol*, 338(3) :377–90. [cité pages 35, 36 et 142]

Watkins, J. C. and Jane, D. E. (2006). The glutamate story. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1 :S100–8. [cité page 26]

Weaver, C. E., Land, M. B., Purdy, R. H., Richards, K. G., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (2000). Geometry and charge determine pharmacological effects of steroids on N-methyl-D-aspartate receptor-induced Ca2+ accumulation and cell death. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(3) :747–754. [cité page 127]

Wee, X. K., Ng, K. S., Leung, H. W., Cheong, Y. P., Kong, K. H., Ng, F. M., Soh, W., Lam, Y., and Low, C. M. (2010). Mapping the high-affinity binding domain of 5-substituted benzimidazoles to the proximal N-terminus of the GluN2B subunit of the NMDA receptor. *Br J Pharmacol*, 159(2) :449–61. [cité pages 152, 231, 232 et 245]

Wei, F., Wang, G. D., Kerchner, G. A., Kim, S. J., Xu, H. M., Chen, Z. F., and Zhuo, M. (2001). Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat Neurosci*, 4(2) :164–9. [cité page 142]

Wermuth, G., Ganellin, C. R., Lindberg, P., and Mitscher, L. A. (1998). Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, 70(5) :1129–1143. [cité page 219]

Westbrook, G. L. and Mayer, M. L. (1987). Micromolar Concentrations of Zn-2+ Antagonize Nmda and Gaba Responses of Hippocampal-Neurons. *Nature*, 328(6131) :640–643. [cité page 108]

Weston, M. C., Schuck, P., Ghosal, A., Rosenmund, C., and Mayer, M. L. (2006). Conformational restriction blocks glutamate receptor desensitization. *Nature Structural and Molecular Biology*, 13(12) :1120–1127. [cité pages 55 et 95]

Williams, K. (1993). Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor-selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Molecular Pharmacology*, 44(4) :851–859. [cité pages 112, 134, 151 et 231]

Williams, K. (1995). Pharmacological properties of recombinant N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors containing the epsilon 4 (NR2D) subunit. *Neurosci Lett*, 184(3) :181–4. [cité pages 119 et 254]

Williams, K. (1997). Interactions of polyamines with ion channels. *Biochem J*, 325 (Pt 2) :289–97. [cité pages 117 et 254]

Williams, K., Kashiwagi, K., Fukuchi, J., and Igarashi, K. (1995). An acidic amino acid in the N-methyl-D-aspartate receptor that is important for spermine stimulation. *Mol Pharmacol*, 48(6) :1087–98. [cité pages 122, 255 et 265]

Williams, K., Romano, C., and Molinoff, P. B. (1989). Effects of polyamines on the binding of [3H]MK-801 to the N-methyl-D-aspartate receptor : pharmacological evidence for the existence of a polyamine recognition site. *Mol Pharmacol*, 36(4) :575–81. [cité pages 117 et 118]

Williams, K., Zappia, A. M., Pritchett, D. B., Shen, Y. M., and Molinoff, P. B. (1994). Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol Pharmacol*, 45(5) :803–9. [cité pages 119, 120, 121, 253, 254, 263, 312, 313 et 315]

Witt, A., Macdonald, N., and Kirkpatrick, P. (2004). Memantine hydrochloride. *Nat Rev Drug Discov*, 3(2) :109–10. [cité pages 136 et 138]

Wollmuth, L. P., Kuner, T., and Sakmann, B. (1998). Adjacent asparagines in the NR2-subunit of the NMDA receptor channel control the voltage-dependent block by extracellular Mg2+. *J Physiol*, 506 (Pt 1) :13–32. [cité page 292]

Wollmuth, L. P. and Sobolevsky, A. I. (2004). Structure and gating of the glutarnate receptor ion channel. *Trends in Neurosciences*, 27(6) :321–328. [cité page 43]

Wong, E., Ng, F. M., Yu, C. Y., Lim, P., Lim, L. H., Traynelis, S. F., and Low, C. M. (2005). Expression and characterization of soluble amino-terminal domain of NR2B subunit of N-methyl-D-aspartate receptor. *Protein Sci*, 14(9) :2275–83. [cité pages 113 et 151]

Wong, H. K., Liu, X. B., Matos, M. F., Chan, S. F., Perez-Otano, I., Boysen, M., Cui, J. K., Nakanishi, N., Trimmer, J. S., Jones, E. G., Lipton, S. A., and Sucher, N. J. (2002). Temporal and regional expression of NMDA receptor subunit NR3A in the mammalian brain. *Journal of Comparative Neurology*, 450(4) :303–317. [cité page 35]

Wright, J. L., Gregory, T. F., Bigge, C. F., Boxer, P. A., Serpa, K., Meltzer, L. T., Wise, L. D., Cai, S. X., Hawkinson, J. E., Konkoy, C. S., Whittemore, E. R., Woodward, R. M., and Zhou, Z. L. (1999). Subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists : Synthesis and biological evaluation of 1-(arylalkynyl)-4-benzylpiperidines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(13) :2469–2477. [cité page 241]

Wright, J. L., Gregory, T. F., Kesten, S. R., Boxer, P. A., Serpa, K. A., Meltzer, L. T., and Wise, L. D. (2000). Subtype-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonists : Synthesis and biological evaluation of 1-(heteroarylalkynyl)-4-benzylpiperidines. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43(18) :3408–3419. [cité page 241]

Wu, F. S., Gibbs, T. T., and Farb, D. H. (1991). Pregnenolone Sulfate - a Positive Allosteric Modulator at the N-Methyl-D-Aspartate Receptor. *Molecular Pharmacology*, 40(3) :333–336. [cité page 124]

Wu, G., Robertson, D. H., Brooks, C. L., r., and Vieth, M. (2003). Detailed analysis of grid-based molecular docking : A case study of CDOCKER-A CHARMm-based MD docking algorithm. *J Comput Chem*, 24(13) :1549–62. [cité page 238]

Wu, L. J. and Zhuo, M. (2009). Targeting the NMDA receptor subunit NR2B for the treatment of neuropathic pain. *Neurotherapeutics*, 6(4) :693–702. [cité page 142]

Wyllie, D. J. A., Behe, P., and Colquhoun, D. (1998). Single-channel activations and concentration jumps : comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors. *Journal of Physiology-London*, 510(1) :1–18. [cité pages 38 et 276]

Xu, J., Kurup, P., Zhang, Y., Goebel-Goody, S. M., Wu, P. H., Hawasli, A. H., Baum, M. L., Bibb, J. A., and Lombroso, P. J. (2009). Extrasynaptic NMDA receptors couple preferentially to excitotoxicity via calpain-mediated cleavage of STEP. *J Neurosci*, 29(29) :9330–43. [cité page 131]

Yamazaki, M., Mori, H., Araki, K., Mori, K. J., and Mishina, M. (1992). Cloning, expression and modulation of a mouse NMDA receptor subunit. *FEBS Lett*, 300(1) :39–45. [cité page 27]

Yao, Y., Harrison, C. B., Freddolino, P. L., Schulten, K., and Mayer, M. L. (2008). Molecular mechanism of ligand recognition by NR3 subtype glutamate receptors. *Embo J*, 27(15) :2158–70. [cité pages 38 et 145]

Yao, Y. N. and Mayer, M. L. (2006). Characterization of a soluble ligand binding domain of the NMDA receptor regulatory subunit NR3A. *Journal of Neuroscience*, 26(17) :4559–4566. [cité page 145]

Yelshansky, M. V., Sobolevsky, A. I., Jatzke, C., and Wollmuth, L. P. (2004). Block of AMPA receptor desensitization by a point mutation outside the ligand-binding domain. *J Neurosci*, 24(20) :4728–36. [cité page 107]

Yuan, H. J., Hansen, K. B., Vance, K. M., Ogden, K. K., and Traynelis, S. F. (2009). Control of NMDA Receptor Function by the NR2 Subunit Amino-Terminal Domain. *Journal of Neuroscience*, 29(39) :12045–12058. [cité pages 59 et 305]

Zhang, L., Zheng, X., Paupard, M. C., Wang, A. P., Santchi, L., Friedman, L. K., Zukin, R. S., and Bennett, M. V. (1994). Spermine potentiation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is affected by subunit composition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(23) :10883–7. [cité pages 119, 120, 254, 312, 313 et 315]

Zhou, M. and Baudry, M. (2006). Developmental changes in NMDA neurotoxicity reflect developmental changes in subunit composition of NMDA receptors. *J Neurosci*, 26(11) :2956–63. [cité page 131]

Zuo, J., De Jager, P. L., Takahashi, K. A., Jiang, W., Linden, D. J., and Heintz, N. (1997). Neurodegeneration in Lurcher mice caused by mutation in delta2 glutamate receptor gene. *Nature*, 388(6644) :769–73. [cité page 44]