

## **Criblage des interactions entre Récepteurs-canaux pentamériques et lipides par fluorescence et dénaturation thermique.**

Les récepteurs-canaux pentamériques (RCPs) tels que les récepteurs nicotiques, glycine et GABA<sub>A</sub> jouent un rôle primordial dans les communications neuronales dans le cerveau. Ces protéines membranaires intégrales combinent plusieurs sites de liaison aux neurotransmetteurs et un canal ionique transmembranaire, la liaison d'agoniste provoquant l'ouverture rapide du canal (activation), puis sa fermeture lente (désensibilisation).

Nous avons cloné le premier RCP bactérien, l'homologue GLIC de la cyanobactérie *Gloeobacter violaceus* qui fonctionne comme un canal ionique activé par les protons (Bocquet et al, Nature 445:116-119 2007). Nous avons par la suite construit une chimère entre le domaine extracellulaire de GLIC et le domaine transmembranaire du récepteur Glycine, qui est également fonctionnelle et dont la structure a été résolue par cristallographie (Moraga-Cid et al, PNAS. 112 :2865-2870 2015).

Dans leur environnement physiologique, ces récepteurs sont intégrés à la membrane plasmique, et certains lipides tels que le cholestérol ont été décrit pour être essentiels à la fonction de ces protéines allostériques. Nous avons en revanche montré que la fonction de GLIC paraissait intacte, même dans l'environnement très artificiel des micelles de détergents (Menny et al, eLife 2017;6:e23955). Cependant, les données d'interaction entre récepteurs et lipide restent très fragmentaires, et nous proposons ici de développer une approche de criblage dans le but d'établir la « pharmacologie lipidique » des récepteurs canaux.

L'approche sera basée sur la technique de stabilisation à la dénaturation thermique, récemment publiée (Nji et al, Nat Commun. 2018 9:4253). Le principe sera de fusionner par biologie moléculaire le récepteur d'intérêt à une « green fluorescent protein », d'exprimer la construction dans les lignées cellulaires d'insecte ou bien humaine (HEK 293), de purifier la protéine en détergent sur une colonne d'affinité, et de mesurer sa stabilité thermique en combinant une chromatographie d'exclusion de taille avec une détection en fluorescence de la GFP. L'adaptation de la procédure en

plaque multipuits permettra de mesurer l'effet de différents lipides (en modulant la nature de leur groupe polaire, la longueur de leur chaîne alkyl, etc...) sur la stabilité thermique, ce qui sera un indicateur de leur liaison. Les expériences seront d'abord réalisées sur la chimère GLIC-GlyR qui est sur-exprimée en cellules d'insectes. Si le temps le permet, d'autres récepteurs tels que les récepteurs nicotiques seront étudiés. Le travail ouvrira la voie à la compréhension des mécanismes de régulation allostériques ayant lieu au niveau du domaine membranaire. Il permettra également d'aborder des expériences de biologie structurale dans un milieu membranaire contrôlé pour résoudre les différentes conformations actives de ces protéines. L'extension du M2 à une thèse financée sur un contrat ERC sera possible.