

Proposition de sujet de thèse

Acronyme: *REAL*

Titre: *Régulation Allostérique de récepteur NMDA: Model computationnel de dynamique du canal ionique*

Résumé : Les récepteurs à NMDA (NMDARs), constituent l'un des principaux types de canaux ioniques activés par le glutamate au niveau du système nerveux central et dans certains tissus non-neuronaux. La dérégulation de l'activité de NMDAR provoque des maladies sévères et par conséquent, la modulation de ces fonctions est une stratégie prometteuse en médecine. Le développement d'un modèle dynamique de NMDAR est crucial pour expliquer sa régulation allostérique à l'échelle atomique et présent une base fondamentale pour postuler la stratégie de la modulation ciblée. Le modèle dynamique, décrivant l'ouverture/fermeture du canal ionique de NMDAR dans son environnement naturel (intégré à la membrane spécifique en milieu aqueux), sera basé sur des simulations de dynamique moléculaire dont seront extraits les mouvements de différent type (local ou global), associées aux fonctions variées (fixation des ligands, transmission du signal, activation du canal). Le projet se base sur les méthodes mathématiques, dites 'classiques', connues et appliquées dans le domaine, et les méthodes novatrices, développés ou en cours de développement au CMLA. Par conséquent, la thèse se constitue de deux composantes – l'une **exploratoire**, en ce qui concerne génération et interprétation des données massives - et l'autre **créative**, en sens de développement de nouvelles méthodes d'analyse de ces données.

Title: *Allosteric Regulation of the NMDA receptor: Computational Model of the Ionic Channel Dynamics*

Summary: NMDA receptors (NMDARs) constitute one of the main types of ion channels activated by glutamate in the central nervous system and in some non-neuronal tissues. Deregulation of the NMDAR activity causes severe maladies and therefore, the modulation of its functions is a promising therapeutic strategy. The development of the NMDAR dynamic model is crucial step to explain its allosteric regulation at the atomic level and presents a fundamental basis for applying the strategy of targeted modulation. The dynamical model describing the opening/closing of the ion channel of NMDAR in its natural environment (receptor integrated on specific membrane in an aqueous medium) will be based on molecular dynamics simulations and decomposition of the NMDAR dynamics associated with the various functions (ligand binding, signal transduction, activation of the channel) on different types of movements (local and global). The project is based on mathematical methods, so called "classic", known and widely applied in the field, and innovative methods, developed or currently under development at CMLA. Therefore, the thesis consists of two components - an **exploratory**, regarding generation and interpretation of massive data - and the other a **creative**, aiming development of new methods for analyzing these data.

Thématique du projet : Il s'inscrit dans le cadre de l'École Doctorale EDMH – Paris Saclay (École Doctorale de Mathématique Hadamard).

Établissement: ENS Cachan Université Paris-Saclay

Laboratoire ou Unité de Recherche : CMLA Centre de Mathématique et de Leurs Appllications (UMR CNRS 8536) & Institut FARMAN (Fédération de Recherche CNRS, FR 3311).

Encadrement :

- Luba Tchertanov : Directrice de recherche CNRS – Laboratoire CMLA
- Alain Trounev : Professeurs des Universités ENS Cachan - Laboratoire CMLA
- Zoltan Palmai : Post Doctorant à ENS Cachan – Laboratoire CMLA

Rôle biologique de NMDAR : Les récepteurs NMDA (NMDARs) sont au centre d'intenses recherches en raison de leur implication dans des processus physiologiques et pathologiques du système nerveux central. Un grand nombre de publications ont aussi montré l'importance de l'activité du NMDAR dans les tissus non-neuronaux. Dans de tels tissus (os, pancréas, peau...) le récepteur NMDA joue différents rôles de régulation. Une attention toute particulière a été portée sur la présence du récepteur NMDA dans les cellules immunitaires et le système cardiovasculaire. Alors qu'il joue un rôle de modulateur de la réponse immunitaire, il est impliqué dans la contraction cardiaque, la circulation coronarienne, et intervient dans les poumons lors de l'induction du stress oxydatif et l'apparition d'œdèmes. Ces récepteurs représentent donc des cibles thérapeutiques très importantes, plusieurs inhibiteurs ont été développés. Cependant, essais cliniques ont montré qu'il est nécessaire d'élaborer des inhibiteurs plus sélectifs pour ces récepteurs spécifiques des tissus ou cellules.

L'activation des récepteurs NMDA requiert non seulement la fixation de deux agonistes, le glutamate (Glu) et la glycine (Gly), mais aussi une dépolarisation de la membrane permettant le départ

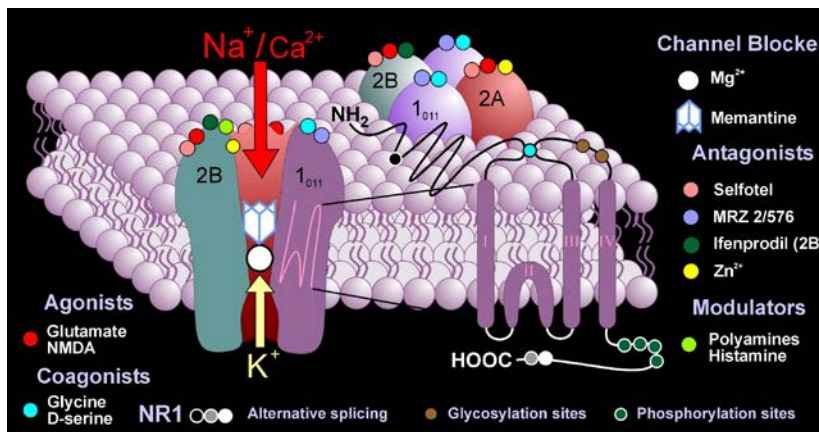
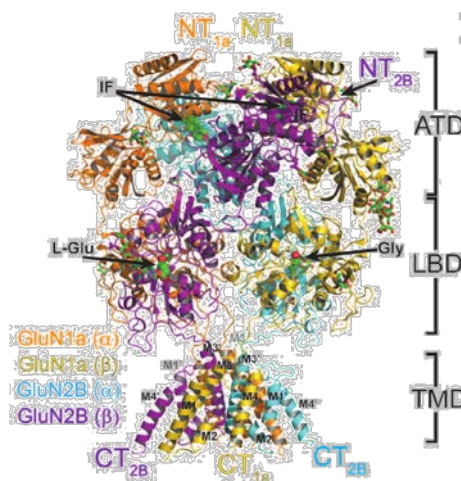


Figure 1. Représentation schématique de NMDAR, intégré à la membrane, et les facteurs contribuant à l'activation du récepteur.

de l'ion Mg^{2+} qui y est fixé dans le canal stabilisant son état fermé. L'activation et l'ouverture de NMDAR sont donc dépendantes du voltage (*voltage-dependent*) et de la fixation des ligands (*ligand-gated*). Ces événements permettent un flux d'ions Ca^{2+} conduits à travers le canal ouvert du récepteur, déclenchant l'activation de certains chemins de signalisation à travers la cellule. Outre le flux calcique, NMDAR est aussi perméable aux cations Na^{2+} et K^+ (**Fig. 1**).

Structure de NMDAR. Le récepteur à NMDA est un hétéro-tétramère, assemblé pour former un canal ionique. Il existe différents types de sous-unités : deux sous-unités GluN1 ubiquitaires et deux sous-unités de type GluN2 et/ou GluN3, déterminant les propriétés du récepteur. Chaque sous-unité

Figure 2. Structure cristallographique 4PE5 de NMDAR, *Nature-2014*



est composée de quatre domaines: le domaine N-terminal (ATD), le domaine de fixation du ligand (LBD), le domaine transmembranaire (TMD) et le domaine intracellulaire C-terminal (CTD) (**Fig. 2**). Chaque domaine structural de chaque sous-unité joue un rôle particulier, mais leurs fonctions sont interdépendantes au niveau local (de la sous-unité) et global (l'effet allostérique). En particulier, l'ATD contribue à l'assemblage et au contrôle de l'ouverture du canal ionique ; il module également la vitesse de désactivation du récepteur ; il est le site d'action pour des modulateurs allostériques tel que le pH, Zn^{2+} , l'ifenprodil et polyamines. Le LBD fixe les agonistes et participe ainsi au déclenchement de l'ouverture du canal ionique. Les TMDs forment à leur interface le canal ionique, potentiellement bloqué par un ion Mg^{2+} dont la fixation est voltage dépendant. Le CTD est le lieu du contrôle par la signalisation intracellulaire, essentielle pour la neuroplasticité. L'ouverture du canal, nécessaire au passage de

cations physiologiques (K^+ , Na^{2+} , Ca^{2+}) entre les milieux extra- et intracellulaires, est donc régulée de manière allostérique par différents effecteurs (Gly, Glu...) qui se fixent sur les sites spécifiques et distants entre eux. Entre autres, l'activation du NMDAR requiert non seulement la fixation de deux agonistes, Gly et Glu, mais aussi une dépolarisation de la membrane.

Objectifs: Pour le projet REAL-NMDAR (d'une durée de 3 à 4 ans) nous planifions d'**étudier les propriétés structurales, dynamiques et énergétiques** caractérisant la plasticité du récepteur entier, pour comprendre les effets de différents effecteurs (agonistes et antagonistes), et décrire **le modèle de canal ionique dans son environnement naturel**. Cette étude permettra de contribuer à une meilleure compréhension du fonctionnement du NMDAR, ce qui sera appliqué dans un deuxième temps à la **conception de nouveaux inhibiteurs ou modulateurs spécifique des fonctions du récepteur**.

Difficultés et problématiques: La topologie générale du NMDAR, décrit à partir des données cristallographique (pdb codes 4PE5 (**Fig. 2**) et 4TLL) a été publiée dans *Nature-2014* et *Science-2014*. Les structures 4PE5 et 4TLL (résolution de 3.96 et 3.59 Å, respectivement) représentent le NMDAR de *Ratus norvegicus* et de *Xenopus laevis*. Ces deux structures caractérisent des protéines mutées (13-16 mutations, incluant des mutations ponctuelles, des délétions et insertions des segments de 10 résidus) co-cristallisés avec les inhibiteurs et/ou agonistes, et présentent le récepteur avec le canal ionique fermé. Pour plusieurs régions fonctionnelles du NMDAR les données sont absentes ou incertaines (par ex., le CTD et les régions du TMD liées au passage de Ca^{2+} et déterminant le blocage 'voltage-dépendent' par le Mg^{2+} ne sont pas résolues dans la structure 4PE5 ; dans 4TLL la position du bloqueur de canal MK-801 n'a pas été localisée). Néanmoins, ces structures serviront de 'templates' pour construire les modèles du récepteur NMDA humain permettant de répondre à des questions spécifiques liés à la **régulation/dérégulation de son fonctionnement et la modulation de ses fonctions**.

Dispositifs utilisés: La modélisation et la simulation de dynamique moléculaire (DM) constituent des outils indispensables pour répondre à ces questions. Elle permettra de comprendre les processus dynamiques responsables des états physiologiques et physiopathologiques, et donnent accès à des propriétés parfois difficiles, voire impossible, à mettre en évidence expérimentalement. Nous visons la simulation de DM du MNDAR pour **caractériser sa régulation allostérique à l'échelle atomique**. L'allostérie est une régulation de la fonction des protéines par la fixation d'un ligand ou une autre protéine, appelé effecteur, sur un site différent du site actif. C'est un phénomène fondamental en biologie – *Jacques Monod disait qu'il était le second secret de la vie, après le code génétique* – résultant de la transmission d'une information (signal), induite par une perturbation locale (effecteur $\equiv$ ligand/protéine/mutation), entre deux sites de la protéine spatialement distants. Cette perturbation mécanique conduit à une séquence de réarrangements conformationnels et changements de la flexibilité dynamique d'un ou plusieurs site(s) éloigné(s).

Nous avons une expertise dans l'application des méthodes de simulations pour caractériser les propriétés structurales, dynamiques et énergétiques des protéines, dont la fonction est altérée, par exemple par des mutations [1-7], par la phosphorylation [8-9], par la liaison avec une autre protéine [10] ou l'ADN [11-12]. Nous possédons l'expérience du développement d'approches originales de calcul pour traitement des images [13] ou pour analyser le réseau de communication (MONETA) en se basant sur la dynamique moléculaire interne et la description topologique d'une protéine [8,14-15]. MONETA a été déjà appliqué pour caractériser plusieurs macromolécules par nous-même [2-3, 8-9, 14] et par une quinzaine de laboratoires à travers du monde.

Programme de recherche envisagée: Le but du projet REAL est la description des mécanismes de la régulation allostérique du NMDAR au niveau atomique et le développement d'un modèle dynamique de canal ionique du NMDAR dans son environnement naturel – le NMDAR intégré à la membrane en milieu aqueux, en absence et en présence d'agonistes ou d'antagonistes. NMDAR est un récepteur membranaire de très grande taille (~5000 résidus), et constitue un vrai défi à cause de

sa complexité (un tétramère composé de deux hétéromères) et sa plasticité conformationnelle stimulé par plusieurs effecteurs. Pour réaliser le projet, une stratégie impliquant la modélisation du récepteur, la simulation de sa dynamique moléculaire (DM) et l'exploration des données de simulations de DM par différentes méthodes d'analyse, existantes ou à développer, sera appliquée selon le schéma suivant :

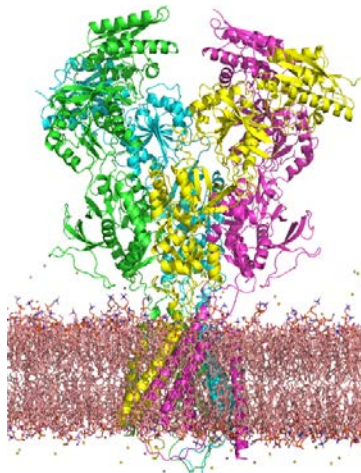


Figure 3. Le modèle du NMDAR intégré à la membrane (eau non présenté).

1) Développement des modèles atomistiques de NMDAR humain, présentent le récepteur sans ligands et avec des ligands (Glu, Gly) fixés sur leurs sites de liaisons dans le domaine LBD en présence et l'absence du Mg^{2+} dans le TMD. 5 modèles à générer à partir des structures cristallographiques.

2) Modélisation d'une membrane contenant un micro-domaine ou 'raft', spécifique pour le NMDAR d'intérêt.

3) Intégration de chaque modèle de NMDAR sur la membrane suivis par une optimisation.

4) Simulations de dynamique moléculaire tout-atome de chaque système incluant le modèle du NMDAR humain inséré dans une membrane (**Fig. 3**) sur une durée de 200 ns. En générale, la simulation de systèmes pareils (protéine + ligands + lipides + eau + ions), nécessite un temps de simulation extrêmement long car les échelles de temps pour atteindre un équilibre thermodynamique sont en général très élevées, de l'ordre de la milliseconde (ms). Une étude très récente permettant d'observer le switch entre l'état actif et inactif du canal ionique en réponse au changement de voltage (VSD)

a été réalisée par des simulations de 400 μs .

5) Analyse des simulations de DM. Les simulations serviront (i) à caractériser les structures équilibrées du NMDAR dans sa forme fermée ; (ii) d'extraire les modes de vibration afin de caractériser l'espace des mouvements collectifs conduisant à l'ouverture du canal; (iii) d'étudier *a posteriori* la communication allostérique entre des sous-unités et entre les domaines (avec l'outil MONETA) ; (iv) obtenir la modèle du NMDAR en forme ouverte ; (v) de rechercher de nouveaux sites d'inhibition potentiels pour stabiliser le récepteur en forme fermé ou bloquer le canal ouvert.

L'analyse des mouvements collectifs permettra d'étudier les corrélations entre différents types de mouvement dans domaines/chaines/fragments distants du NMDAR. Il a été établi expérimentalement qu'une fermeture des sous-domaines du domaine LBD de NMDAR devrait être corrélée avec l'ouverture du canal. Nous espérons décrire ce phénomène à partir de simulations, ce qui constituera une première validation des calculs, et trouver d'autres types de corrélations qui ne sont pas encore connues. Cette analyse nous permettra (i) de déterminer les mouvements de grande amplitude les plus pertinents intervenants dans l'ouverture du canal qu'on pourra explorer par DM et (ii) de localiser les voies de communication. Cette partie de thèse s'appuiera également sur nos recherches précédentes dans ce domaine et qui ont donné lieu à la conception de MONETA [8,14-15] visant la localisation et 'visualisation' de la transmission d'information à travers le réseau de résidus d'une protéine. Pour pouvoir établir les liens entre les différents domaines/chaines/fragments distants du NMDAR, permettant la régulation allostérique de l'ouverture/fermeture du canal, le développement/évolution de nouvelles approches d'analyse des simulations ont été envisagées.

En parallèle, nous planifions de mettre au point l'application des simulations en approximation gros-grains, l'approche largement appliquée aux lipides, membranes, protéines membranaire et les systèmes très complexes. Les simulations gros-grains seront appliquées au NMDAR – un 'benchmark' pour les simulations massives. Les données issues de deux types de simulation – tous atomes et gros-grains – seront confrontées.

Environnement de travail : équipes concernées, partenariat :

Le projet s'inscrira au sein de l'institut FARMAN de l'ENS Cachan, institut fédératif regroupant cinq laboratoires (CMLA, LMT, LSV, LURPA et SATIE) autour de la modélisation, la simulation numérique et l'ingénierie des systèmes complexes. Au sein du CMLA, le projet sera supporté par deux équipes, BiMoDyM (Bioinformatique, Modélisation et Dynamique Moléculaire) pilotée par L. Tchertanov et SIP (Signal and Image Processing) piloté par A. Trouvé.

REAL s'appuie sur les projets pluridisciplinaires en cours:

(i) NUTS (*Les NMDARs, des cibles inattendues dans l'hypertension artérielle pulmonaire/NMDA receptors, Unexpected TargetS in pulmonary arterial hypertension*, ANR, 2015-2017), réunissant les expertises de trois équipes – des biologistes (S. Kaminsky-Cohen, Laboratoire Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Thérapeutique, AP-HP Centre Chirurgical Marie-Lannelongue), des chimistes (M. Alami, BioCIS, Faculté de Pharmacie de Chatenay-Malabry) permettent de valider nos modèles (L. Tchertanov, BiMoDyM, CMLA, ENS de Cachan).

(ii) ICAR (*Identification de Chemins Allosteriques à travers l'analyse de Réseaux*) basé sur les compétences complémentaires des trois équipes-partenaires de l'institut FARMAN: mathématiciens (SIP, A. Trouvé, CMLA), informaticiens (MeXiCo, S. Haar, LSV) et les chercheurs en biologie computationnelle et structurale (BiMoDyM, L. Tchertanov, CMLA), qui vise à définir des descripteurs valides et d'élaborer de nouvelles approches analytiques ou adapter des méthodes développer pour les systèmes statistiques [13] permettant l'interprétation des données de simulation de dynamique moléculaire des protéines ciblées à l'échelle atomique.

(iii) DIGISCOPE, un dispositif de moyens d'interaction et de visualisation installé sur plusieurs sites de l'université Paris-Saclay, inclus l'Ecole Normale Cachan, en sein le quelle des approches immersives de la modélisation moléculaire en réalité virtuelle [16] autour la plateforme SHIVA (Shared Interaction & Visualisation Area) [17] sont en cours d'évolution.

Compétences requises

Le candidat pour ce projet devra posséder des connaissances en biologie structurale, en application/développement des méthodes bio-informatique de modélisation et simulation moléculaire. Une base solide en méthodes mathématique et informatique est requise.

Références

1. Laine, E., Chauvot, d. B., I, Perahia, D., Auclair, C., & Tchertanov, L. (2011). Mutation D816V alters the internal structure and dynamics of c-KIT receptor cytoplasmic region: implications for dimerization and activation mechanisms. *PLoS. Comput. Biol.* 7, e1002068, doi:10.1371/journal.pcbi.1002068 [doi];
2. Chapuzet A., Goulois J., Chatron N., Tchertanov L., Lambert V. Benoit E., Lattard V. (2015). The first detection of a target resistance to antivitamin K rodenticides in the black rat *Rattus* – Identification and characterization of a new mutation in the VKORC1. *Pest Manag Sci.* 2015 Apr 7. doi: 10.1002/ps.4020.
3. Chauvot, d. B., I, Allain, A., Panel, N., Laine, E., Trouve, A., Dubreuil, P., & Tchertanov, L. (2014). Hotspot mutations in KIT receptor differentially modulate its allosterically coupled conformational dynamics: impact on activation and drug sensitivity. *PLoS. Comput. Biol.* 10, e1003749, doi:10.1371/journal.pcbi.1003749
4. Da Silva Figueiredo Celestino Gomes, Panel, N., Laine, E., Pascutti, P. G., Solary, E., & Tchertanov, L. (2014). Differential effects of CSF-1R D802V and KIT D816V homologous mutations on receptor tertiary structure and allosteric communication. *PLoS. One.* 9, e97519, doi:10.1371/journal.pone.0097519 [doi];PONE-D-14-07239 [pii].
5. Gardie B., Couvé, S., Ladroue, C., Laine, E., Mathouk, K., Guégan, J., Gad, S., Lejeune, H. Lecomte, B., Pagès, J.-C., Collin, C., Lasne F., Bressac de Paillerets, B., Feunteun, J. Dessen, P., Lazar, V., Tchertanov, L., Mole, D., Kaelin, W., Ratcliffe, P., Richard, S. (2014). A comprehensive study of germline mutations in the VHL gene reveals the importance of precisely tuned dysregulation of the hypoxia pathway in oncogenesis. *Cancer Res.* 2014 Nov 15; 74(22):6554-64. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1161.
6. Vita, M., Tisserand, J., Chauvot de Beauchêne, I., Panel, N., Tchertanov, L., Agopian, J., Mascam Mancini, L., Fouet, B., Fournier, B., Dubreuil, P., Bertucci, F., & De Sepulveda, P. (2014). Characterization of S628N, a novel KIT mutation found in a metastatic melanoma. *JAMA Dermatology* doi:10.1001/jamadermatol.2014.143.
7. Ni, X., Abdel-Azeim, S., Laine, E., Arora, R., Osemwota, O., Marcelin, A. G., Calvez, V., Mouscadet, J. F., & Tchertanov, L. (2012). In Silico and In Vitro Comparison of HIV-1 Subtypes B and CRF02_AG Integrases Susceptibility to Integrase Strand Transfer Inhibitors. *Adv. Viro.* 2012, 548657, doi:10.1155/2012/548657 [doi].

8. Allain, A., Chauvot de Beauchêne, I., Langenfeld, F., Guarracino, Y., Laine, E., & Tchertanov, L. (2014). Allosteric Pathway Identification through Network Analysis: from Molecular Dynamics simulations to Interactive 2D and 3D graphs. *Faraday Discussions* DOI:10.1039/C4FD00024B., 1-18.
9. Langenfeld F., Guarracino Y., Arock M., Trouvé and Tchertanov L. (2015). How intrinsic molecular dynamics controls intramolecular communication in Signal Transducers and Activators of Transcription Factor STAT5. *PLOS ONE*. Submitted at 20-01-2015.
10. Arlet, J. B., Ribeil, J. A., Guillem, F., Negre, O., Hazoume, A., Marcion, G., Beuzard, Y., Dussiot, M., Moura, I. C., Demarest, S., de Beauchene, I. C., Belaid-Choucair, Z., Sevin, M., Maciel, T. T., Auclair, C., Leboulch, P., Chretien, S., Tchertanov, L., Baudin-Creuz, V., Seigneure, R., Fontenay, M., Garrido, C., Hermine, O., & Courtois, G. (2014). HSP70 sequestration by free alpha-globin promotes ineffective erythropoiesis in beta-thalassaemia. *Nature*, doi:nature13614 [pii];10.1038/nature13614 [doi].
11. Arora, R., de Beauchene, I. C., Polanski, J., Laine, E., & Tchertanov, L. (2013). Raltegravir flexibility and its impact on recognition by the HIV-1 IN targets. *J. Mol. Recognit.* 26, 383-401, doi:10.1002/jmr.2277 [doi].
12. Arora, R. & Tchertanov, L. Arora R. and Tchertanov L. (2013). *The HIV-1 Integrase: Modeling and Beyond*. Chapter 15 (pp 377-403) in the Book “*An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*”. Ed. G. Radis-Baptista, INTECH. ISBN 980-953-307-586-5.
13. Charon N. and Trouvé A. (2013). The varifold representation of non-oriented shapes for diffeomorphic registration. *SIAM Journal of Imaging Science* 6(4): 2547-2580
14. Laine, E., Auclair, C., & Tchertanov, L. (2012). Allosteric communication across the native and mutated KIT receptor tyrosine kinase. *PLoS. Comput. Biol.* 8, e1002661, doi:10.1371/journal.pcbi.1002661 [doi].
15. Tchertanov, L., Laine, E., Allain, A., & Chauvot de Beauchêne, I. (2014). MONETA - Modular Network Analysis. INTERDEPOSIT CERTIFICATION 2014. Certificat délivré par Agence pour la Protection des Programmes. Inter Deposit Digital Number IDDN.FR.001.020012.000.S.P.2014.000.31235 ENS Cachan.
16. McIntosh-Smith, Tchertanov L, Nerukh D, Stone J, Baaden M, Hayward, Glowacki, Olson A, Zoppè M, Petrov, Hall, Reiher, Brancale, Haag, O'Donoghue, Brooks, Raffin, Iakovou, Chavent, Montes, Baker, Thomas, Woods, Hirst. (2014). Computing power revolution and new algorithms: GP-GPUs, clouds and more: general discussion. *Faraday Discuss.*; 169:379-401. doi: 10.1039/c4fd90021a. Epub 2014 Oct 9
17. De Vuyst F., Guillas S., Kendira A., Labourdette C., Tchertanov L. (2014). L'ENS Cachan voit grand avec le mur d'image SHIVA. *HPC Today*. 26 sept. 2014. <http://www.hpctoday.fr/regional/lens-cachan-voit-grand-avec-le-mur-dimages-shiva/>.