

## Rôle des toxines dans l'étude fonctionnelle et structurale des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine

par Carole Fruchart-Gaillard, André Ménez & Denis Servent

CEA, Département d'Ingénierie et d'Études des Protéines, CE Saclay, 91191 Gif/Yvette. E-mail : carole.gaillard@cea.fr

Reçu le 7 novembre 2004

### RÉSUMÉ

Les toxines animales ont souvent été très utiles dans la compréhension des modes de fonctionnement de leurs différentes cibles. Celles qui interagissent au niveau des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine sont purifiées à partir de venin de serpents ou de cônes marins. Pour leur haute affinité et leur sélectivité d'interaction, ces toxines sont utilisées depuis une trentaine d'années comme de véritables sondes moléculaires permettant d'identifier, de localiser et de purifier ces récepteurs. Par ailleurs, ces toxines ont joué un rôle majeur dans la compréhension des spé-

cificités fonctionnelles des différents sous-types de récepteurs et ont permis d'accéder à des informations structurales les concernant. L'obtention de ces toxines par voie chimique ou recombinante, l'introduction de résidus non naturels au sein de leurs séquences et la connaissance structurale de leur site d'interaction permet d'envisager la conception de nouveaux ligands ayant des sélectivités prédéfinies et pouvant avoir un intérêt en tant qu'outils pharmacologiques et/ou agents thérapeutiques dans les nombreuses pathologies impliquant ces récepteurs.

### SUMMARY Critical role of peptidic toxins in the functional and structural analysis of nicotinic acetylcholine receptors

Animal toxins which interact on various receptors and channels have been often used in the studies of the functional roles of these targets. Nicotinic toxins have been purified from snake and cone venoms and are characterized by high affinity and various selectivity of interactions on the different nicotinic receptors subtypes. Since 30 years they have been used as molecular probes to identify, localize and purify these receptors. Furthermore, they have played a crucial role in the better understanding of their functional properties and have been useful in their structural

studies. These peptidic toxins could be chemically synthesized or recombinantly expressed and non-natural residues could be introduced in their sequences in order to delineate their functional interaction sites. The structural modelisation of toxin-nAChR interaction allows us to understand the antagonistic property of these toxins and open the way to the design of engineered ligands with predetermined specificity, useful as pharmacological tools or therapeutic agents in the numerous diseases involving this receptor family.

### HISTORIQUE

Au XVII<sup>e</sup> siècle, le poète et scientifique italien Francesco Redi (1621-1697), fondateur de la parasitologie et auteur de «*De Venenis Animalibus*», décrit l'appareil venimeux de la Vipère et du Scorpion, démontre qu'un «*suc jaune*», le venin, est à l'origine de l'effet nocif des morsures de vipères, et réfute les fables circulant à leur sujet. Au XVIII<sup>e</sup> siècle, un autre Italien, Felice Fontana (1720-1805) comprend le premier que le venin est formé de nombreuses substances et fonde les bases de la toxicologie. Au début du XIX<sup>e</sup> siècle, débutent les premiers travaux visant à identifier le contenu d'un venin de serpent. Parmi les nombreux scientifiques qui œuvrent dans

ce domaine, le prince Lucien Bonaparte (1775-1845), frère de Napoléon, publie en 1843 «*Analyse du venin de vipère et découverte de la vipérine*». La nature protéique des venins est ensuite proposée par Pelder. En 1893, Martin sépare le venin d'un serpent australien en deux fractions. Une fraction produit des hémorragies et l'autre bloque la respiration. Les principes actifs des venins commencent à être cernés. En cette fin de XIX<sup>e</sup> siècle, il devient clair que les venins d'élapidés et d'hydrophiidés renferment un principe actif possédant des propriétés semblables à celles du curare. Au début du XX<sup>e</sup> siècle, A. Calmette (1863-1933) montre la possibilité de se protéger des effets nocifs des venins par une sérothérapie appropriée.

Parallèlement à ces recherches, en 1857, un physiologiste français, Claude Bernard, émet l'hypothèse que des toxines animales ou végétales pourraient entraîner la mort en interférant avec des centres d'activité essentiels pour la vie tels que les systèmes nerveux ou musculaire. A l'aide de plusieurs expérimentations, il démontre que l'injection de curare dans le système sanguin abolit les mouvements réflexes des muscles squelettiques et entraîne la paralysie, sans pour autant supprimer l'excitation électrique des nerfs de l'animal. Il conclut alors que les systèmes nerveux et musculaire sont distincts l'un de l'autre et qu'il doit exister une communication entre le muscle et la stimulation nerveuse. John Newport Langley découvre alors qu'en absence de stimulation électrique, l'introduction de nicotine entre le nerf et le muscle provoque la contraction musculaire, contrairement à l'effet observé en présence de curare. Il conclut alors que l'impulsion nerveuse ne doit pas passer du nerf au muscle par une décharge électrique mais par la sécrétion d'une substance spéciale au niveau de la terminaison nerveuse. L'acétylcholine est alors découverte (Dale, 1914). L'utilisation de différents agonistes tels que la nicotine et la muscarine a ensuite permis de mettre en évidence, au niveau de la jonction neuromusculaire, la présence de substances réceptives capables de réagir d'une part avec l'acétylcholine et la nicotine et, d'autre part, avec l'acétylcholine et la muscarine. Ces substances réceptives sont respectivement nommées récepteurs nicotiques et muscariniques de l'acétylcholine.

Par ailleurs, il a été observé que la saturation de préparations membranaires de muscle de grenouille par la d-tubocurarine est capable d'inhiber l'action irréversible du venin de cobra. Ceci indique que des sites de liaison similaires sont impliqués dans l'action de la d-tubocurarine et les constituants actifs des venins de serpent (Su & Lee, 1960). Les progrès remarquables qui ont suivi dans le domaine de la chromatographie ont permis de

séparer les protéines en fonction de leur charge ou de leurs propriétés hydrophobes, antigéniques ou fonctionnelles. Au milieu des années 1960 et de manière quasiment simultanée, plusieurs équipes dont celle de Lee et Chang à Taiwan, isolent les premières toxines curarisantes des venins des serpents. Ils mettent également en évidence par électrophysiologie que ces toxines curarisantes bloquent de façon irréversible la transmission neuromusculaire sur des préparations membranaires d'organe électrique de torpille (Changeux *et al.*, 1970). Ces toxines curarisantes apparaissent alors comme d'excellents outils permettant d'étudier le récepteur nicotique de l'acétylcholine

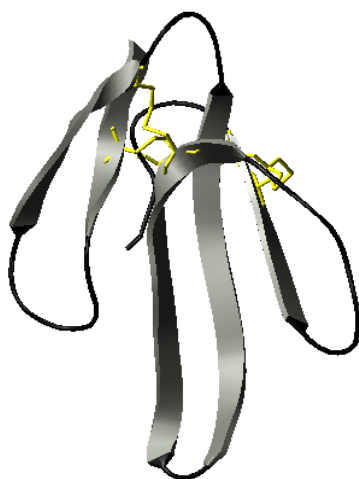
### LES TOXINES ANIMALES QUI AGISSENT AU NIVEAU DES RÉCEPTEURS NICOTINIQUES DE L'ACÉTYLCHOLINE

Les toxines animales ont souvent été très utiles dans la compréhension des modes de fonctionnement de leurs différentes cibles et ont parfois été indispensables à l'obtention de la structure tridimensionnelle de celles-ci. Parmi les toxines animales capables d'agir sur les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine, on distingue les toxines curarisantes ou neurotoxines présentes dans les venins d'élapidés et d'hydrophiidés, les  $\alpha$ -conotoxines présentes dans le venin de cônes marins (Fig. 1) et les waglérines présentes dans le venin de vipère.

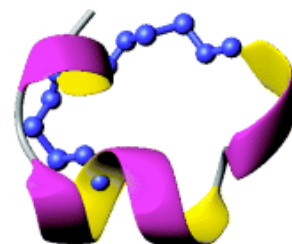
#### Les neurotoxines

L'ensemble de ces toxines présente une structure tridimensionnelle commune, appelée « structure à trois doigts », provenant d'un positionnement conservé de quatre ponts disulfure (Ménez, 1998). Ces toxines nicotiques ont été classées en quatre sous-familles suivant

FIG. 1. – Structures tridimensionnelles d'une neurotoxine à trois doigts issue de venin de serpent et d'une  $\alpha$ -conotoxine issue de venin de cône marin.



neurotoxine  
« à trois doigts »



$\alpha$ -conotoxine

leur séquence primaire, le nombre de ponts disulfure et l'affinité qu'elles possèdent pour les différents sous-types de récepteurs nicotiques (Servent & Ménez, 2001). Les  $\alpha$ -neurotoxines ou toxines courtes possèdent 60 à 62 acides aminés, quatre ponts disulfure, et lient sélectivement avec une haute affinité les récepteurs de type musculaire seulement. Les  $\alpha/\kappa$ -neurotoxines ou toxines longues sont constituées de 66 à 74 résidus, possèdent un cinquième pont disulfure en bas de la boucle II et fixent avec une haute affinité les récepteurs de type musculaire et les récepteurs homopentamériques de type  $\alpha 7$ . Les  $\kappa$ -neurotoxines ont 66 résidus, quatre ponts disulfure et fixent sélectivement les récepteurs neuronaux de type  $\alpha 3\beta 2$ . Les neurotoxines non conventionnelles dites "weak toxines" possèdent un cinquième pont disulfure à l'extrémité de la boucle I et reconnaissent avec une faible affinité le récepteur de type musculaire et parfois le récepteur homopentamérique  $\alpha 7$ .

### Les $\alpha$ -conotoxines.

Il existe une très grande diversité de conotoxines provenant de 700 espèces de cônes répertoriées à ce jour. Ces toxines ont été classées en différentes familles suivant le nombre de ponts disulfure qu'elles possèdent, l'arrangement de ces ponts disulfure et la cible qu'elles atteignent. Les  $\alpha$ -conotoxines sont de petits peptides de 11 à 19 acides aminés réticulés par deux ponts disulfure. Ces molécules ont une structure très compacte et sont ainsi relativement stables. Elles inhibent de façon compétitive les récepteurs nicotiques de type musculaire ou neuronaux. Les  $\alpha$ -conotoxines GI, MI, SI et EI, isolées respectivement de *C. geographus*, *C. magus*, *C. striatus* et de *C. ermineus* ciblent sélectivement le récepteur nicotique du muscle squelettique des mammifères. En plus de leur sélectivité musculaire, certaines de ces conotoxines permettent de distinguer les deux sites de liaison  $\alpha\gamma$  et  $\alpha\delta$ . Les  $\alpha$ -conotoxines GI et MI possèdent une affinité 10 000 fois supérieure pour le site  $\alpha\delta$  que pour le site  $\alpha\gamma$  (Gray *et al.*, 1981; Martinez *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 1982). L' $\alpha$ -conotoxine ImI purifiée du venin de *C. imperialis*, bloque sélectivement les récepteurs homopentamériques  $\alpha 7$  (Johnson *et al.*, 1995; McIntosh *et al.*, 1994). Les  $\alpha$ -conotoxines PnIA et PnIB bloquent les récepteurs neuronaux  $\alpha 3\beta 2$  et  $\alpha 7$ . La sélectivité de ces deux toxines vis-à-vis de ces deux sous-types de récepteurs neuronaux est associée au changement d'un seul résidu dans la séquence primaire des toxines (Luo & McIntosh, 1999; Hogg & Adams, 1999). L' $\alpha$ -conotoxine MII bloque les récepteurs  $\alpha 3\beta 2$  (Cartier *et al.*, 1996) et ceux contenant la sous-unité  $\alpha 6$  (McIntosh *et al.*, 2004). L' $\alpha$ -conotoxine AuIB agit sélectivement au niveau des récepteurs  $\alpha 3\beta 4$  (Luo *et al.*, 1998) et l' $\alpha$ -conotoxine EpI inhibe à la fois les récepteurs  $\alpha 3\beta 2$  et  $\alpha 3\beta 4$  (Loughnan *et al.*, 1998).

### Les waglérines

Les waglérines (Wtx) sont des toxines isolées à partir du venin d'un serpent appartenant à la famille des Vipe-

ridae, *Tropidolaemus wagleri*. Ces toxines ne ressemblent pas aux toxines dites «à trois doigts» : elles sont composées de 22 à 24 résidus, ne possèdent qu'un seul pont disulfure et ont une structure globulaire (Chuang *et al.*, 1996). Elles agissent comme des antagonistes compétitifs du récepteur nicotique de type musculaire. Elles possèdent une sélectivité à plusieurs niveaux pour le récepteur nicotique musculaire (Molles *et al.*, 2002a; Molles *et al.*, 2002b). Elles ont une sélectivité d'espèce en reconnaissant 100 fois mieux le récepteur de souris que le récepteur du rat ou de l'Homme. Elles opèrent une sélection entre le récepteur nicotique embryonnaire et le récepteur nicotique mature de souris. L'affinité des waglérines pour la forme mature du récepteur musculaire ( $\alpha\beta\gamma\epsilon$ ) est 3 700 fois plus élevée que pour la forme embryonnaire ( $\alpha\beta\gamma\delta$ ). Le dernier niveau de sélectivité concerne les deux sites de fixation des ligands du récepteur mature de souris. L'affinité des waglérines est 2 100 fois plus grande pour le site  $\alpha\epsilon$  que pour le site  $\alpha\delta$  (Molles *et al.*, 1998; Molles *et al.*, 2002a; Molles *et al.*, 2002b).

Les toxines peptidiques qui agissent au niveau des récepteurs nicotiques, qu'elles soient purifiées à partir de venin de serpents ou de cônes marins, sont donc de véritables outils pharmacologiques capables d'interagir sélectivement sur un grand nombre de sous-types de récepteurs, permettant ainsi d'étudier leurs fonctions. Leur obtention par voie chimique ou recombinante et l'introduction de résidus non naturels au sein de leurs séquences permet, d'une part, de caractériser leur site fonctionnel et, d'autre part, d'envisager la conception de nouveaux ligands ayant des sélectivités prédéfinies et pouvant avoir un intérêt comme agent thérapeutique dans les nombreuses pathologies impliquant ces récepteurs.

### PURIFICATION, LOCALISATION DU RÉCEPTEUR NICOTINIQUE DE L'ACÉTYLCHOLINE À L'AIDE DES TOXINES CURARISANTES ET IDENTIFICATION DU SITE DE LIAISON DES LIGANDS

Du fait de sa présence en grande quantité dans l'organe électrique de torpille, le récepteur nicotique de l'acétylcholine a été le premier récepteur de la famille des récepteurs couplés à un canal ionique à être étudié. Après solubilisation, il a été purifié sur colonne d'affinité à l'aide de toxines curarisantes immobilisées sur sépharose (Potter, 1974; Ringler *et al.*, 1997; Schmidt & Raftery, 1973; Sobel *et al.*, 1977). Ensuite le marquage radioactif par du tritium ou de l'iode 125 de telles toxines (Ménez *et al.*, 1971) a permis de mesurer les constantes cinétiques de dissociation et d'association de ces toxines vis-à-vis du récepteur nicotique de l'acétylcholine (Weber & Changeux, 1974) et de déterminer les constantes d'inhibition de différents agonistes et antagonistes compétitifs de ce récepteur. Par ailleurs, les toxines radio-marquées ont permis de localiser par autoradiographie *in situ* sur tissus intacts la présence de récepteurs

de l'acétylcholine au niveau de la membrane postsynaptique de la jonction neuro-musculaire et du système nerveux central (Barrantes *et al.*, 1995; Clarke & Pert, 1985; Moore & Brady, 1977; Watson *et al.*, 1988). Le marquage de ces toxines par des sondes fluorescentes a également permis de localiser sur des coupes de tissus la présence de récepteurs nicotiques au niveau de la membrane postsynaptique de la jonction neuromusculaire (Barbier *et al.*, 2004).

Il y a une trentaine d'année, l'utilisation de tels outils a permis d'aborder l'étude structurale du récepteur nicotinique de l'acétylcholine. En 1973, Cartaud et Changeux ont observé pour la première fois en microscopie électronique le récepteur de l'acétylcholine purifié à partir de membranes d'organe électrique de torpille. Les premières images suggèrent la présence de rosettes typiques d'un arrangement pentamérique. Les cinq sous-unités de cette molécule oligomérique sont disposées régulièrement autour d'un canal ayant un diamètre extérieur de 70 Å (Unwin *et al.*, 1985). Le récepteur de torpille est formé de quatre sous-unités différentes, nommées  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  et  $\delta$  qui s'associent suivant la stoechiométrie  $2\alpha\beta\gamma\delta$  (Reynolds & Karlin, 1978). Par la suite, plusieurs équipes, dont celle de Changeux et Raftery, ont identifié la séquence en acides aminés de la partie N-terminale de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de Torpille (1980). En 1983, les ADN complémentaires codant les différentes sous-unités du récepteur de Torpille ont été publiés (Devillers-Thierry *et al.*, 1983; Giraudat *et al.*, 1982; Numa *et al.*, 1983; Patrick *et al.*, 1983). Les groupes de Changeux, Heinemann et Numa proposent alors un modèle d'organisation transmembranaire des sous-unités du récepteur de Torpille. Chaque sous-unité est composée de quatre segments transmembranaires, d'un large domaine N-terminal extracellulaire et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique.

À l'heure actuelle, aucune structure tridimensionnelle à l'échelle moléculaire d'un récepteur couplé à un canal ionique n'est disponible. Notre compréhension du fonctionnement du récepteur nicotinique de l'acétylcholine est basée sur des approches chimiques et génétiques combinées à la microscopie électronique et aux méthodes de prédiction structurale. Néanmoins, les différentes structures du récepteur obtenues successivement par Unwin à une résolution de 9 Å, 7,5 Å, 4,6 Å en microscopie électronique ont révélé que deux cavités correspondant aux sites de liaison de l'acétylcholine sont situées dans la partie extracellulaire des sous-unités  $\alpha$  à une distance de 30 Å de la membrane. Une autre étude réalisée également en microscopie électronique sur le complexe récepteur nicotinique/ $\alpha$ -bungarotoxine a montré que la toxine se lie également à deux sites présents dans la partie extracellulaire du récepteur (Holtzman *et al.*, 1982). Par ailleurs, la purification de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur nicotinique et le marquage de cette sous-unité par l' $\alpha$ -bungarotoxine iodée révèle que cette sous-unité est impliquée dans la liaison de tels ligands (Tzartos & Changeux, 1984). Les premières expériences de marquage par liaison covalente de dérivés tritiés contenant un ammonium quaternaire (TDF) ont révélé l'impli-

cation des cystéines 192 et 193 du domaine extracellulaire de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur dans le site de liaison de l'acétylcholine (Kao & Karlin, 1986). En 1985, il a été montré que le fragment 173-204 de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur de torpille est protégé de la digestion protéolytique lorsque l' $\alpha$ -bgtx est complexée à ce récepteur (Wilson *et al.*, 1984). Le docapeptide (KHW-VYYTCCPDT) obtenu par synthèse peptidique, correspondant à la séquence protéique 185-196 de cette sous-unité est capable de lier l' $\alpha$ -bgtx avec une faible affinité (de l'ordre de  $10^{-5}$  M), suggérant que cette région est accessible à la surface du récepteur et qu'elle contient des déterminants moléculaires impliqués dans la liaison de la toxine (Neumann *et al.*, 1986). La résolution par RMN de la structure du complexe  $\alpha$ -bgtx/peptide 185-196 du récepteur de torpille a mis en évidence des contacts intermoléculaires entre les boucles I, II et l'extrémité C-terminale de l' $\alpha$ -bgtx et le peptide récepteur (Basus *et al.*, 1993). Par la suite, l'ingénierie de peptides obtenus soit après présentation à la surface du phage, soit par chimie combinatoire, a permis d'obtenir des peptides récepteurs capables de lier l' $\alpha$ -bungarotoxine avec une affinité de 2 nM (Balass *et al.*, 1997; Kasher *et al.*, 2001). L'obtention de tels peptides récepteurs confirme donc que les déterminants majoritairement impliqués dans la liaison des neurotoxines se trouvent dans cette région de la sous-unité  $\alpha$  du récepteur. Ces peptides pourraient ainsi être utilisés comme antidote de l' $\alpha$ -bungarotoxine suite à une morsure par *Bungarus multicinctus* (Scherf *et al.*, 1997; Scherf *et al.*, 2001). Par ailleurs, la photoincorporation de toxine  $\alpha$  tritiée révèle que les sous-unités  $\alpha$  et non- $\alpha$  contribuent au site de liaison de la toxine, suggérant que ce site d'interaction se situe à l'interface de ces sous-unités (Chatrenet *et al.*, 1990; Oswald & Changeux, 1982).

#### UTILISATION DE TOXINES NICOTINIQUES MODIFIÉES POUR ÉTUDIER L'INTERACTION DE CES TOXINES SUR LE RÉCEPTEUR NICOTINIQUE

Initialement, la modification chimique de neurotoxines au niveau de certains résidus a permis de mettre en évidence l'implication fonctionnelle de résidus chargés positivement (Lys et Arg) et de résidus aromatiques (Trp et Tyr) de ces toxines dans leur liaison au récepteur nicotinique (Chicheportiche *et al.*, 1975; Faure *et al.*, 1983; Hervé *et al.*, 1992). En dépit d'efforts considérables en matière de modifications chimiques, il n'a pas été possible par cette technique d'évaluer l'implication fonctionnelle de tous les résidus d'une neurotoxine lors de sa liaison au récepteur.

L'accès à l'analyse complète de la séquence peptidique d'une neurotoxine a été rendu possible grâce à la mise au point au laboratoire d'un système d'expression recombinante performant de ces toxines chez *E. coli* (Drevet *et al.*, 1997; Ducancel *et al.*, 1989) et à la mutagenèse dirigée. De ce fait, des toxines naturelles et mutées ont été obtenues et leur affinité vis-à-vis de récep-

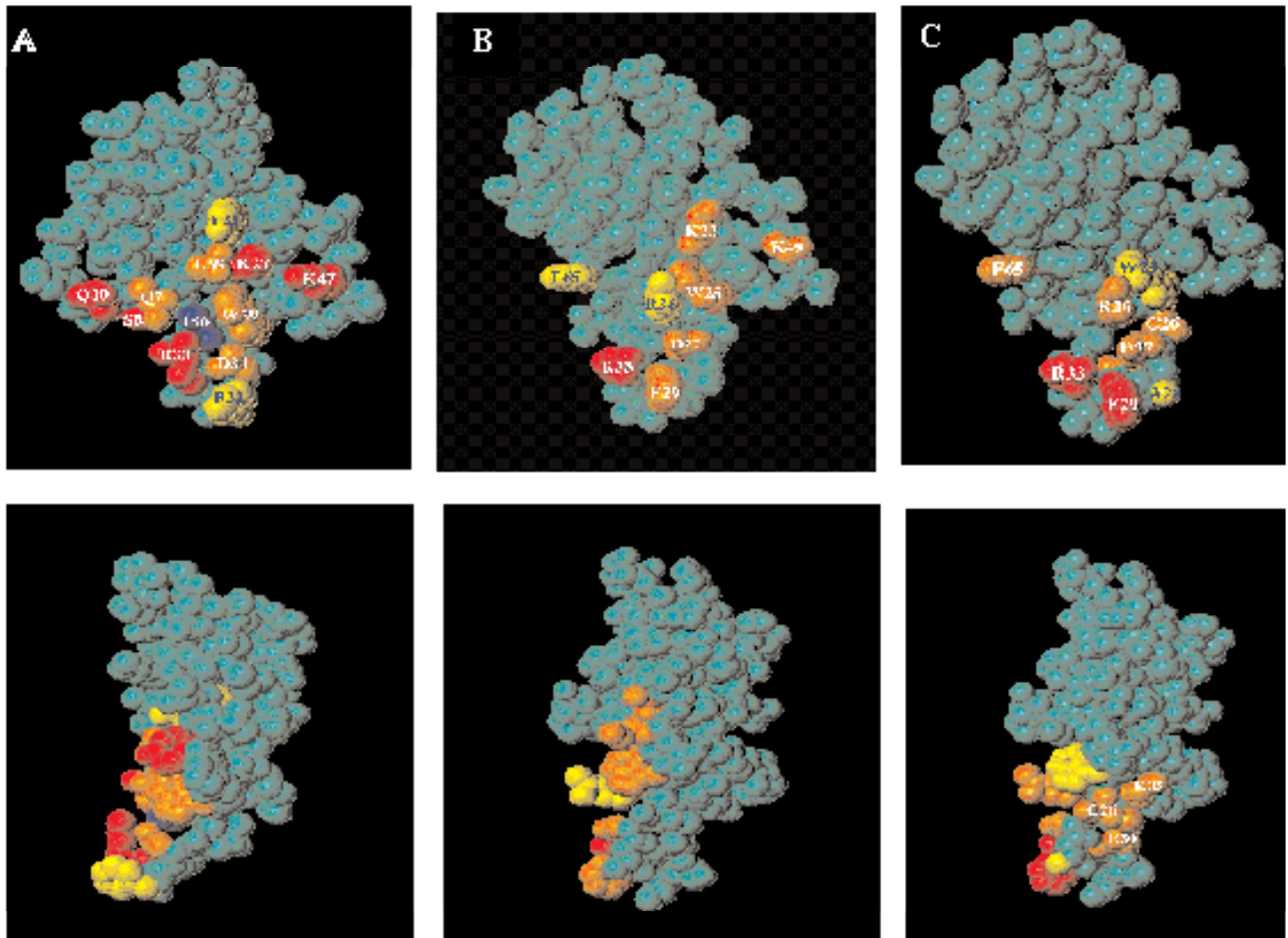


FIG. 2. – En A, représentation du site toxique de l'érabutoxine a lors de l'interaction Ea/récepteur de torpille (Ducancel *et al.*, 1996). En B, représentation du site toxique de l' $\alpha$ -cobratoxine lors de l'interaction  $\alpha$ -cbtx/récepteur de torpille (Antil *et al.*, 1999). En C, représentation du site toxique de l' $\alpha$ -cobratoxine lors de l'interaction  $\alpha$ -cbtx/récepteur  $\alpha 7$  (Antil-delbeke *et al.*, 2000). Pour chaque interaction, la toxine est représentée de face avec la face concave vers le lecteur et de profil avec la face concave vers la gauche et la face convexe vers la droite. La mutation des résidus colorés en jaune, orange et rouge provoque respectivement une perte d'affinité d'un facteur 3 à 9, 10 à 100 et supérieur à 100.

teurs nicotiniques a été évaluée. Ces données ont ainsi permis d'identifier d'une part les sites fonctionnels d'une neurotoxine courte (Ea) et d'une neurotoxine longue ( $\alpha$ -CbtX) pour le récepteur de type musculaire et, d'autre part, le site fonctionnel d'une neurotoxine longue ( $\alpha$ -CbtX) vis-à-vis des récepteurs de type musculaire et neuronal  $\alpha 7$ . La figure 2 représente les différents sites fonctionnels identifiés lors de ces trois interactions et permet de comparer, d'une part, la façon par laquelle deux toxines différentes reconnaissent le même récepteur et, d'autre part, comment une même toxine interagit vis-à-vis de deux récepteurs distincts.

Il semble donc que pour interagir sur un même récepteur, le récepteur musculaire, deux toxines courte et longue utilisent à la fois des résidus communs, localisés sur leur face concave et de façon identique dans leurs structures 3D (Arg-33, Asp-31, Lys-27, Lys-47), mais aussi des résidus propres à chacune des deux familles de

toxines, localisés dans le bas de la boucle I (Gln7, Ser8, Gln10) pour la toxine courte, et au niveau de l'extrémité C-terminale (Phe-65) pour la toxine longue (Antil *et al.*, 1999). De la même manière, la toxine longue reconnaît les récepteurs de type musculaire et neuronal  $\alpha 7$  en utilisant à la fois des résidus identiques localisés sur la face concave de la toxine dans le bas de la boucle II (Trp-25, Phe-29, Arg-33, Arg-36) et au niveau de l'extrémité C-terminale (Phe-65) mais également des résidus propres à chacune des deux interactions. Ainsi le cinquième pont disulfure présent dans le bas de la boucle II et un résidu de la face convexe (Lys-35) de la toxine longue contribuent uniquement à la liaison au récepteur neuronal  $\alpha 7$  tandis que certains résidus du haut de la boucle II (Lys23) et du bas de la boucle III (Lys49) sont impliqués spécifiquement dans la liaison au récepteur de type musculaire (Antil-Delbeke *et al.*, 2000). Ces informations suggèrent très fortement que l'expression de la spécificité des toxi-

nes résulte d'un processus évolutif fondé sur la rétention d'un dénominateur commun constitué ici de quelques résidus-clés. À partir de résidus conservés, comme notamment l'arginine 33, des liaisons ciblées vers tel ou tel type de récepteur peuvent apparaître par l'adjonction d'un petit nombre de mutations appropriées, localisées sur le pourtour du dénominateur commun de liaison. Il s'agit là d'un avantage évident, car il permet de voir un déterminant fonctionnel évoluer d'une spécificité vers une autre, en mettant en œuvre des événements mutationnels limités.

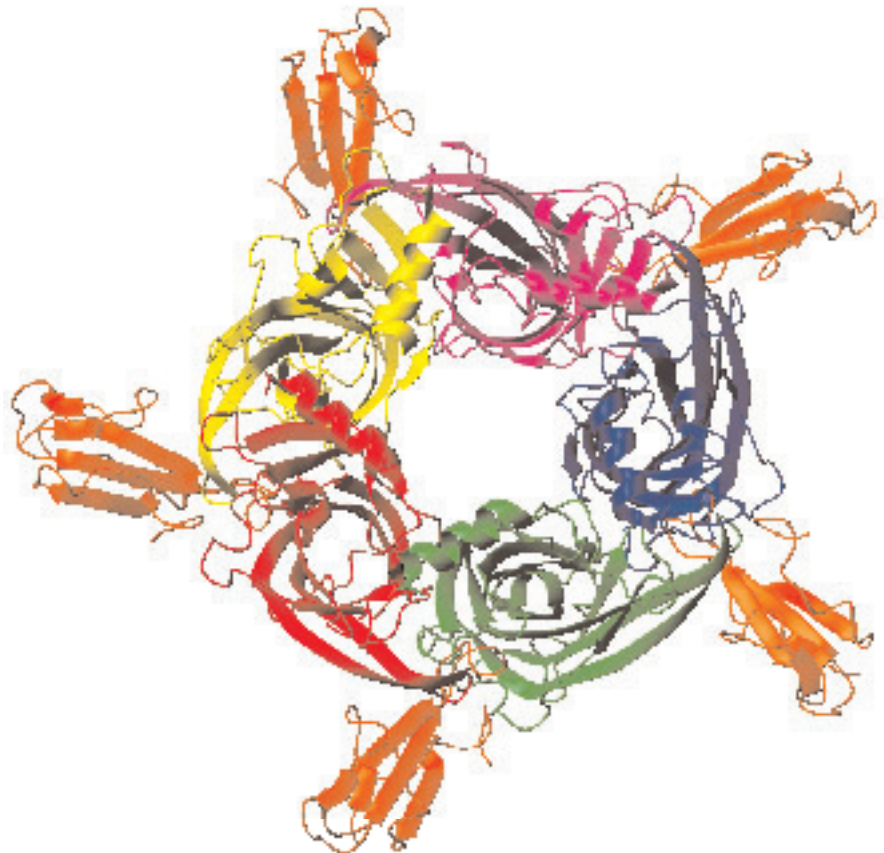
Afin de pouvoir identifier les résidus du récepteur  $\alpha 7$  impliqués dans la liaison à la toxine, nous avons effectué une analyse mutationnelle exhaustive sur ce récepteur, principalement au niveau des régions préalablement identifiées comme étant cruciales dans l'interaction de petits ligands (ACh, d-tubocurarine, nicotine) (Chiara *et al.*, 1997, 1998). Les récepteurs  $\alpha 7$  naturels ou mutés sont exprimés en cellules HEK, sur lesquelles les expériences de liaison sont effectuées. De nombreux résidus ont été identifiés principalement au niveau de la région C (Phe-186, Tyr-187, Tyr194, asp196) et, en moindre mesure, au niveau des régions D (Trp-54) et F (Asp-163) comme étant fonctionnellement importants dans la formation du complexe toxine/récepteur. Ces résultats combinés à ceux obtenus lors de l'étude du site fonctionnel de l' $\alpha$ -CbtX vis-à-vis du récepteur  $\alpha 7$  ont permis d'envisager d'appliquer la méthodologie des cycles de

doubles mutants. Cette approche initialement développée par A. Fersht permet, à partir de la caractérisation de l'affinité des différentes paires d'interaction toxines naturelles et mutées, récepteurs naturels et mutés, d'identifier les paires de résidus à proximité dans le complexe toxine/récepteur (Schreiber & Fersht, 1995).

En sélectionnant, d'une part, les résidus fonctionnels de l' $\alpha$ -CbtX préalablement identifiés et, d'autre part, ceux mis en évidence au niveau du récepteur  $\alpha 7$ , neuf paires de résidus ont été identifiées comme étant à proximité lors de l'interaction. Ces proximités sont caractérisées par des variations d'énergie libre d'interaction supérieures à une valeur seuil de 0,7 kcal/mol. Le rôle fonctionnel majeur de la région C du récepteur (résidus 180 à 200) est clairement mis en évidence et plus particulièrement les résidus aromatiques (Phe-186, Tyr-187, Tyr-194) qui semblent effectuer des interactions de types cation-P avec des résidus chargés positivement de la toxine (Arg-33, Lys-35). En outre, des interactions entre résidus aromatiques (Phe-65 de la toxine et Phe186 du récepteur) ou de type électrostatique (Arg-36 de la toxine et Asp-196 du récepteur) semblent aussi intervenir dans la stabilisation de la liaison  $\alpha$ -CbtX/récepteur  $\alpha 7$  (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2002).

Par ailleurs et de façon concomitante aux résultats décrits précédemment, la structure cristallographique d'une protéine liant l'acétylcholine, isolée à partir des cellules gliales d'escargot de mer (AChBP), et présentant

FIG. 3. – Modèle structural du complexe récepteur  $\alpha 7/\alpha$ -cbtx vue de dessus. Les cinq sous-unités du récepteur sont disposées en rosette. Les cinq molécules de toxine se situent à l'interface des cinq sous-unités (Fruchart-Gaillard & Servent, 2002).



une forte analogie de séquence avec le domaine extracellulaire des récepteurs nicotiques a été publiée (Brejc *et al.*, 2001). Cette structure nous a alors permis de modéliser le domaine extracellulaire du récepteur  $\alpha 7$  et d'y introduire les contraintes de proximité issues de notre analyse mutationnelle afin d'obtenir un modèle de l'interaction  $\alpha$ -Cbtx/récepteur  $\alpha 7$  (Fig. 3) (Fruchart-Gaillard *et al.*, 2002). D'après le modèle obtenu, la toxine se situe à l'interface de deux sous-unités du récepteur, en position médiane du domaine extracellulaire et de façon quasi-perpendiculaire à l'axe du récepteur. Seule l'extrémité de la boucle centrale de la toxine pénètre dans l'interface de deux sous-unités du récepteur, la partie C-terminale de la toxine semble, quant à elle, stabiliser cette interaction. De ce fait, seulement 25 % de la surface totale de la toxine correspondant à 2000 Å<sup>2</sup> participe à cette interaction. Ce modèle a été validé expérimentalement *a posteriori*, par un nouveau cycle de double mutant, non testé initialement (Phe-29 de la toxine et Tpr-54 du récepteur) et qui a été suggéré par le modèle structural du complexe. L'analyse détaillée de ce modèle permet de confirmer le rôle majeur de l'Arg-33 de la toxine, située au cœur d'une cage de résidus aromatiques du récepteur, de façon identique à celle prédite pour l'ammonium quaternaire de l'acétylcholine.

Ce modèle structural du complexe toxine/récepteur obtenu sur la base de résultats expérimentaux explique les propriétés antagonistes des toxines nicotiques vis-à-vis des récepteurs nicotiques du fait de l'inaccessibilité de l'acétylcholine à son site de liaison en présence de la toxine. En même temps que la publication de ces travaux, d'autres groupes ont proposé d'autres modèles d'interaction concernant, d'une part, l'interaction toxine courte/récepteur musculaire (Teixeira-Clerc *et al.*, 2002) et, d'autre part, l'interaction toxine longue/récepteur musculaire (Samson *et al.*, 2002). L'étude comparative de ces modèles structuraux nous permet de constater que, dans tous les cas, la toxine nicotinique se lie à l'interface de deux sous-unités du récepteur et à mi-hauteur du domaine extracellulaire de ce dernier. Cependant, il est intéressant de remarquer que l'angle formé entre la toxine et le récepteur au sein des complexes varie en fonction du sous-type de récepteur (musculaire ou neuronal  $\alpha 7$ ) et du type de neurotoxine utilisée (toxine longue ou courte). Ces observations suggèrent, d'une part, que les neurotoxines ne se positionneraient pas toutes de façon identique sur un même récepteur et, d'autre part, que les différents sous-types de récepteurs n'interagiraient pas tous de façon identique avec une même neurotoxine. Ces conclusions sont d'ailleurs en adéquation avec les études fonctionnelles menées sur différents complexes toxines/ récepteurs.

## CONCLUSION

L'examen de la littérature nous a permis de mettre en évidence l'importance primordiale qu'a eu l'utilisation de toxines peptidiques dans les premières phases d'étude du récepteur nicotinique de l'acétylcholine, notamment en permettant sa localisation au sein de différents organes

ou cellules et sa purification et caractérisation à partir d'organe électrique de torpille. Elles ont également joué un rôle majeur dans l'étude des spécificités pharmacologiques et fonctionnelles de ces récepteurs. Finalement, elles ont permis de progresser dans la caractérisation structurale du récepteur nicotinique de l'acétylcholine.

D'autre part, la diversité naturelle de ces toxines et la possibilité de les modifier « à façon » permet d'envisager des applications à la fois en tant qu'outils pharmacologiques mais aussi comme agents thérapeutiques. Dans ce contexte, il a été récemment montré qu'une nouvelle  $\alpha$ -conotoxine de *C. victoriae*, (Vc1.1), antagoniste compétitif des récepteurs nicotiques neuronaux, pourrait être utilisée dans les traitements antidouleur (Sandall *et al.*, 2003), comme c'est déjà le cas de la conotoxine MVIIA ciblant les canaux calciques (Bowersox & Luther, 1998 ; Malmberg & Yaksch, 1995). Des bloqueurs nicotiques spécifiques du sous-type  $\alpha 7$  auraient aussi un grand intérêt dans le traitement de certains types de cancers (Codiñola *et al.*, 1994 ; Trombino *et al.*, 2004).

Par ailleurs, les toxines nicotiques ne sont pas les seules toxines à trois doigts capables d'interagir avec des récepteurs de la synapse cholinergique. En effet, les toxines muscariniques et les fasciculines lient respectivement, sans réaction croisée, les récepteurs muscariniques et l'acétylcholinestérase. Cette structure à trois doigts, même si elle semble particulièrement bien adaptée aux fonctions toxiques ciblant la synapse cholinergique, est aussi présente dans d'autres toxines interagissant avec les récepteurs impliqués dans l'agrégation plaquettaire (mambine), ou les canaux Ca<sup>2+</sup> de type L (calciceptines). De plus, le repliement à trois doigts ne semble pas restreint aux fonctions toxiques. En effet, au cours de ces dernières années plusieurs protéines endogènes susceptibles d'adopter une telle structure ont été découvertes. Ces protéines appartenant à la famille Ly-6/uPAR se répartissent en deux sous-familles suivant qu'elles possèdent ou non une ancre GPI. Elles exercent des fonctions variées, associées à des phénomènes de maturation du système immunitaire, d'adhérence ou de communication cellulaire ou de transduction de signaux. Deux d'entre elles apparaissent particulièrement intéressantes par leur capacité à interagir et à moduler le fonctionnement de récepteurs nicotiques du système nerveux central (Lynx, (Miwa *et al.*, 1999)) ou périphérique (Slurp-1, (Chimienti *et al.*, 2003)). L'ensemble des connaissances accumulées lors des études des interactions toxines à trois doigts/récepteurs nicotiques devrait nous permettre de mieux comprendre comment ces « prototoxines » endogènes reconnaissent leur cible, et leur rôle au sein de notre organisme.

## BIBLIOGRAPHIE

Antil S., Servent D. & Ménez A., Variability among the sites by which curaremimetic toxins bind to *Torpedo* acetylcholine receptor, as revealed by identification of the functional residues of  $\alpha$ -Cobratoxin. *J. Biol. Chem.*, 1999, 274, 34851-34858.

- Antil-Delbeke S., Gaillard C., Tamiya T., Corringier P. J., Changeux J. P., Servent D. & Ménéz A., Molecular determinants by which a long chain toxin from snake venom interacts with the neuronal  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 29594-29601.
- Balass M., Katchalski-Katzir E. & Fuchs S., The  $\alpha$ -bungarotoxin binding site on the nicotinic acetylcholine receptor: Analysis using a phage-epitope library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 6054-6058.
- Barbier J., Lamthanh H., Le Gall F., Favreau P., Benoit E., Chen H., Gilles N., Ilan N., Heinemann S. H., Gordon D., Menez A. & Molgo J., A  $\delta$ -conotoxin from *Conus ermineus* venom inhibits inactivation in vertebrate neuronal Na<sup>+</sup> channels but not in skeletal and cardiac muscles. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 4680-4685.
- Barrantes G. E., Rogers A. T., Lindstrom J. & Wonnacott S.,  $\alpha$ -bungarotoxin binding sites in rat hippocampal and cortical cultures: initial characterisation, colocalisation with  $\alpha 7$  subunits and up-regulation by chronic nicotine treatment. *Brain Res.* 1995, 672, 228-236.
- Basus V. J., Song G. & Hawrot E., NMR solution structure of an  $\alpha$ -bungarotoxin/nicotinic receptor peptide complex. *Biochemistry*, 1993, 32, 12290-12298.
- Bowersox S. S. & Luther R., Pharmacotherapeutic potential of  $\omega$ -conotoxin MVIIA (SNX-111), an N-type neuronal calcium channel blocker found in the venom of *Conus magus*. *Toxicon*, 1998, 36, 1651-1658.
- Brejk K., van Dijk W. J., Klaassen R. M., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A. B. & Sixma T. K., Crystal structure of an ACh-binding protein reveals the ligand-binding domain of nicotinic receptors. *Nature*, 2001 411, 269-276.
- Cartier G. E., Yoshikami D., Gray W. R., Luo S., Olivera B. M. & McIntosh J. M., A new  $\alpha$ -conotoxin which targets  $\alpha 3\beta 2$  nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 7522-7528.
- Changeux J. P., Kasai M. & Lee C. Y., Use of snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1970, 67, 1241-1247.
- Chatrenet B., Tremeau O., Bontems F., Goeldner M. P., Hirth C. G. & Menez A., Topography of toxin-acetylcholine receptor complexes by using photoactivatable toxin derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 3378-3382.
- Chiara D. C., Middleton R. E. & Cohen J. B., Identification of amino acids contributing to high and low affinity d-tubocurarine sites in the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 32940-32950.
- Chiara D. C., Middleton R. E. & Cohen J. B., Identification of tryptophan 55 as the primary site of [<sup>3</sup>H]nicotine photoincorporation in the  $\gamma$ -subunit of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *FEBS Letter*, 1998, 423, 223-226.
- Chicheportiche R., Vincent J.-P., Kopeyan C., Schweitz H. & Lazdunski M., Structure-function relationship in the binding of snake neurotoxins to the Torpedo membrane receptor. *Biochemistry*, 1975, 14, 2081-2091.
- Chimienti F., Hogg R. C., Plantard L., Lehmann C., Brakch N., Fischer J., Huber M., Bertrand D. & Hohl D., Identification of SLURP-1 as an epidermal neuromodulator explains the clinical phenotype of Mal de Meleda. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, 12, 3017-3024.
- Chuang L. C., Yu H. M., Chen C., Huang T. H., Wu S. H. & Wang K. T., Determination of three-dimensional solution structure of waglerin-1, a toxin from *Trimeresurus wagleri*, using 2D-NMR and molecular dynamics simulation. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, 1292, 145-155.
- Clarke P. B. & Pert A., Autoradiographic evidence for nicotine receptors on nigrostriatal and mesolimbic dopaminergic neurons. *Brain Res.*, 1985, 348, 355-358.
- Codignola A., Tarroni P., Cattaneo M. G., Vicentini L. M., Clementi F. & Sher E., Serotonin release and cell proliferation are under the control of  $\alpha$ -bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett.*, 1994, 342, 286-290.
- Devillers-Thiery A., Giraudat J., Bentaboulet M. & Changeux J. P., Complete mRNA coding sequence of the acetylcholine binding  $\alpha$ -subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor: a model for the transmembrane organization of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1983, 80, 2067-2071.
- Drevet P., Lemaire C., Gasparini S., ZinnJustin S., Lajeunesse E., Ducancel F., Pinkasfeld S., Courcon M., Tremeau O., Boulain J. C. & Ménéz A., High-level production and isotope labeling of snake neurotoxins, disulfide-rich proteins. *Protein Express. Purif.*, 1997, 10, 293-300.
- Ducancel F., Boulain J. C., Trémeau O. & Ménéz A., Direct expression in *E. coli* of a functionally active protein A-snake toxin fusion protein. *Protein Engineering*, 1989, 3, 139-143.
- Faure G., Boulain J. C., Montenay-Garestier T., Fromageot P. & Menez A., Role of indole and amino groups in the structure and function of *Naja nigricollis* toxin  $\alpha$ . *Biochemistry*, 1983, 22, 2068-2076.
- Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., Le Novère N., Tamiya T., Corringier P. J., Changeux J. P., Ménéz A. & Servent D., Experimentally-based model of a complex between a snake toxin and the  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99, 3216-3221.
- Giraudat J., Devillers-Thiery A., Auffray C., Rougeon F. & Changeux J. P., Identification of a cDNA clone coding for the acetylcholine binding subunit of *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. *Embo J.*, 1982, 1, 713-717.
- Gray W. R., Luque A., Olivera B. M., Barrett J. & Cruz L. J., Peptide toxins from *Conus geographus* venom. *J. Biol. Chem.*, 1981, 256, 4734-4740.
- Hervé M., Pillet L., Humbert P., Tremeau O., Ducanel F., Hirth C. & Menez A., Role and environment of the conserved Lys 27 of snake curaremimetic toxins as probed by chemical modifications, site-directed mutagenesis and photolabelling experiments. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 208, 125-131.
- Holtzman E., Wise D., Wall J. & Karlin A., Electron microscopy of complexes of isolated acetylcholine receptor, biotinyl-toxin and avidin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 310-314.
- Johnson D. S., Martinez J., Elgoyhen A. B., Heinemann S. F. & McIntosh J. M.  $\alpha$ -Conotoxin Iml exhibits subtype-specific nicotinic acetylcholine receptor blockade: preferential inhibition of homomeric  $\alpha 7$  and  $\alpha 9$  receptors. *Mol. Pharmacol.*, 1995, 48, 194-199.
- Kao P. N. & Karlin A., Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J. Biol. Chem.*, 1986, 261, 8085-8088.
- Kasher R., Balass M., Scherf T., Fridkin M., Fuchs S. & Katchalski-Katzir E., Design and synthesis of peptides that bind  $\alpha$ -bungarotoxin with high affinity. *Chem. Biol.*, 2001, 8, 147-155.
- Loughnan M., Bond T., Atkins A., Cuevas J., Adams D. J., Broxton N. M., Livett B. G., Down J. G., Jones A., Alewood P. F. & Lewis R. J.,  $\alpha$ -conotoxin Epl, a novel sulfated peptide from *Conus episcopatus* that selectively targets neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 15667-15674.
- Luo S., Kulak J. M., Cartier G. E., Jacobsen R. B., Yoshikami D., Olivera B. M. & McIntosh J. M.,  $\alpha$ -conotoxin AuIB selectively blocks  $\alpha 3\beta 4$  nicotinic acetylcholine receptors and nicotine-evoked norepinephrine release. *J. Neurosci.*, 1998, 18, 8571-8579.
- Malmberg A. B. & Yaksch J. L., Effect of continuous intrathecal infusion of  $\omega$ -conopeptides, N-type calcium channel blockers, on behavior and anti-nociception in the formation and hot-plate tests in rats. *Pain*, 1995, 60, 83-90.



- Martin B. M., Chibber B. A. & Maelicke A., The sites of neurotoxicity in  $\alpha$ -cobratoxin. *J. Biol. Chem.* 1983, 258, 8714-8722.
- Martinez J. S., Olivera B. M., Gray W. R., Craig A. G., Groebe D. R., Abramson S. N. & McIntosh J. M.,  $\alpha$ -Conotoxin EI, a new nicotinic acetylcholine receptor antagonist with novel selectivity. *Biochemistry*, 1995, 34, 14519-14526.
- McIntosh J. M., Azam L., Staheli S., Dowell C., Lindstrom J. M., Kuryatov A., Garrett J. E., Marks M. J. & Whiteaker P., Analogs of  $\alpha$ -conotoxin MII are selective for  $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol. Pharmacol.*, 2004, 65, 944-952.
- McIntosh J. M., Yoshikami D., Mahe E., Nielsen D. B., Rivier J. E., Gray W. R. & Olivera B. M., A nicotinic acetylcholine receptor ligand of unique specificity,  $\alpha$ -conotoxin ImI. *J. Biol. Chem.*, 1994, 269, 16733-16739.
- McIntosh M., Cruz L. J., Hunkapiller M. W., Gray W. R. & Olivera B. M., Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1982, 218, 329-334.
- Ménez A., Functional architectures of animal toxins: a clue to drug design? *Toxicon*, 1998, 36, 1557-1572.
- Ménez A., Morgat J. L., Fromageot P., Ronsanay A. P., Boquet P. & Changeux J. P., Tritium labelling of the  $\alpha$ -neurotoxin of *Naja nigricollis*. *FEBS Letters*, 1971, 17, 333-335.
- Miwa J. M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G. W., Sanchez R., Sali A., Role L. W. & Heintz N., lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS. *Neuron*, 1999, 23, 105-114.
- Molles B. E., Kline E. F., Sine S. M., Mc Ardle J. J. & Taylor P., Probing the structure of the ligand binding site on the muscle nicotinic receptor with Waglerin peptides. *J. Physiol. (Paris)*, 1998, 92, 470-471.
- Molles B. E., Rezaei P., Kline E. F., Mc Ardle J. J., Sine S. M. & Taylor P., Identification of residues at the  $\alpha$  and  $\epsilon$  subunit interfaces mediating species selectivity of Waglerin-1 for nicotinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.*, 2002a, 277, 5433-5440.
- Molles B. E., Tsigelny I., Nguyen P. D., Gao S. X., Sine S. M. & Taylor P., Residues in the  $\epsilon$  subunit of the nicotinic acetylcholine receptor interact to confer selectivity of waglerin-1 for the  $\alpha$ - $\epsilon$  subunit interface site. *Biochemistry*; 2002b, 41, 7895-7906.
- Moore W. M. & Brady R. N., Studies of nicotinic acetylcholine receptor protein from rat brain. II. Partial purification. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 498, 331-340.
- Neumann D., Barchan D., Fridkin M. & Fuchs S., Analysis of ligand binding to the synthetic dodecapeptide 185-196 of the acetylcholine receptor  $\alpha$  subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 9250-9253.
- Numa S., Noda M., Takahashi H., Tanabe T., Toyosato M., Furutani Y. & Kikuyotani S., Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1983, 48 Pt 1, 57-69.
- Oswald R. E. & Changeux J. P., Crosslinking of  $\alpha$ -bungarotoxin to the acetylcholine receptor from *Torpedo marmorata* by ultraviolet light irradiation. *FEBS Lett.*, 1982, 139, 225-229.
- Patrick J., Ballivet M., Boas L., Claudio T., Forrest J., Ingraham H., Mason P., Stengelin S., Ueno S. & Heinemann S., Molecular cloning of the acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 1983, 48 Pt 1, 71-78.
- Potter L. T.,  $\alpha$ -bungarotoxin (and similar  $\alpha$ -neurotoxins) and nicotinic acetylcholine receptors. *Methods Enzymol.*, 1974, 32, 309-323.
- Reynolds J. A. & Karlin A., Molecular weight in detergent solution of acetylcholine receptor from *Torpedo californica*. *Biochemistry*, 1978, 17, 2035-2038.
- Ringler P., Kessler P., Menez A. & Brisson A., Purification of the nicotinic acetylcholine receptor protein by affinity chromatography using a regioselectively modified and reversibly immobilized  $\alpha$ -toxin from *Naja nigricollis*. *Biochim. Biophys. Acta*. 1997, 1324, 37-46.
- Samson A., Scherf T., Eisenstein M., Chill J. & Anglister J., The mechanism for acetylcholine receptor inhibition by  $\alpha$ -neurotoxins and species-specific resistance to  $\alpha$ -bungarotoxin revealed by NMR. *Neuron*, 2002, 35, 319-332.
- Sandall D. W., Satkunanathan N., Keays D. A., Polidano M. A., Liping X., Pham V., Down J. G., Khalil Z., Livett B. G. & Gayler K. R., A novel  $\alpha$ -conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves *in vivo*. *Biochemistry*, 2003, 42, 6904-6911.
- Scherf T., Balass M., Fuchs S., Katchalski-Katzir E. & Anglister J., Three-dimensional solution structure of the complex of  $\alpha$ -bungarotoxin with a library-derived peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 6059-6064.
- Scherf T., Kasher R., Balass M., Fridkin M., Fuchs S. & Katchalski-Katzir E., A  $\beta$ -hairpin structure in a 13-mer peptide that binds  $\alpha$ -bungarotoxin with high affinity and neutralizes its toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 6629-6634.
- Schmidt J. & Raftery M. A., Purification of acetylcholine receptors from *Torpedo californica* electroplax by affinity chromatography. *Biochemistry*, 1973, 12, 852-856.
- Schreiber G. & Fersht A. R., Energetics of protein-protein interactions: analysis of the barnase-barstar interface by single mutations and double mutant cycles. *J. Mol. Biol.*, 1995, 248, 478-486.
- Servent D. & Ménez A., Snake neurotoxins that interact with nicotinic acetylcholine receptors, in *Handbook of Neurotoxicology* (Massaro EJ ed.) pp. 385-425, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2001.
- Sobel A., Weber M. & Changeux J. P., Large-scale purification of the acetylcholine receptor protein in its membrane-bound and detergent-extracted forms from *Torpedo marmorata* electric organ. *Eur. J. Biochem.*, 1977, 80.
- Su C. & Lee C. Y., The mode of neuromuscular blocking action of chlorpromazine. *Bri. Pharm. Chemother.*, 1960, 15, 88-94.
- Teixeira-Clerc F., Menez A. & Kessler P., How do short neurotoxins bind to a muscular-type nicotinic acetylcholine receptor? *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 25741-25747.
- Trombino S., Cesario A., Margaritora S., Granone P., Motta G., Falugi C. & Russo P.,  $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors affect growth regulation of human mesothelioma cells: role of mitogen-activated protein kinase pathway. *Cancer Res.*, 2004, 64, 135-145.
- Tzartos S. J. & Changeux J. P., Lipid-dependent recovery of  $\alpha$ -bungarotoxin and monoclonal antibody binding to the purified  $\alpha$ -subunit from *Torpedo marmorata* acetylcholine receptor. Enhancement by noncompetitive channel blockers. *J. Biol. Chem.*, 1984, 259, 11512-11519.
- Unwin R. J., Moss S., Peart W. S. & Wadsworth J., Renal adaptation and gut hormone release during sodium restriction in ileostomized man. *Clin. Sci. (London)*, 1985, 69, 299-308.
- Watson J. T., Adkins-Regan E., Whiting P., Lindstrom J. M. & Podleski T. R., Autoradiographic localization of nicotinic acetylcholine receptors in the brain of the zebra finch (*Poephila guttata*). *J. Comp. Neurol.*, 1988, 274, 255-264.
- Weber M. & Changeux J. P., Binding of *Naja nigricollis* [3H]  $\alpha$ -toxin to membrane fragments from *Electrophorus* and *Torpedo* electric organs. *Mol. Pharmacol.*, 1974, 10, 15-34.
- Wilson P. T., Gershoni J. M., Hawrot E. & Lentz T. L., Binding of  $\alpha$ -bungarotoxin to proteolytic fragments of the  $\alpha$  subunit of *Torpedo* acetylcholine receptor analyzed by protein transfer on positively charged membrane filters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, 81, 2553-2557.