

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Spécialité :
Chimie et Neurobiologie
(Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé)

Présentée par
Damien LEMOINE

Pour obtenir le grade de
Docteur de l'université de Strasbourg

**MISE AU POINT D'OUTILS OPTOGENETIQUES POUR
LA PHOTOREGULATION DE L'ACTIVITE DES
RECEPTEURS CANAUX P2X**

Soutenance orale le 15 novembre 2013

Composition du Jury :
Dr Eric BOUE-GRABOT
Dr Michel VIVAUDOU
Dr Gaëtan MISLIN
Dr Pierre PAOLETTI
Dr Alexandre SPECHT
Dr Thomas GRUTTER

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

Thèse effectuée au sein de l'équipe Chimie et Neurobiologie Moléculaire

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Chimie et Neurobiologie Moléculaire à la faculté de pharmacie de Strasbourg, sous la direction du Dr Thomas GRUTTER. Je voudrais lui témoigner ma très profonde reconnaissance pour m'avoir accueilli et accordé sa confiance en me laissant une grande liberté dans l'accomplissement de ce travail.

Je voudrais remercier vivement les Drs Eric BOUEGRABOT, Michel VIVAUDOU, Gaëtan MISLIN, Pierre PAOLETTI et Alexandre SPECHT de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail de thèse et de l'honneur qu'ils me font en acceptant de le juger.

Je remercie très sincèrement le Dr Alexandre SPECHT, co-directeur du laboratoire, pour son aide si précieuse en synthèse chimique, sa disponibilité et ses conseils tout au long de ma thèse.

Je remercie également le Dr Antoine TALY qui m'a permis d'appréhender sereinement les expériences de bioinformatique.

Je remercie le Dr Ruotian JIANG pour m'avoir initié à l'électrophysiologie patch-clamp.

Je remercie chaleureusement l'ensemble de mes collègues, Adeline, pour ses petits mutants, Chloé, pour m'avoir donné son aide précieuse en électrophysiologie, Sébastien, qui aime la chimie dans l'eau, attention au gruttant, David, Fred, Jeff, et Thierry, le meilleur charentais de France, pour leur aide et leur soutien. Bonne route au « petit » nouveau Mahboubi.

Enfin je remercie le CNRS et l'Université de Strasbourg et l'ANR pour leur soutien financier.

Je remercie les récepteurs P2X pour être activés par l'ATP, molécule que j'apprécie particulièrement.

Vive le langage unix, l'ATP et le sca.

Je témoigne ma très grande reconnaissance à ma famille que j'aime fort. Vous avez su trouver les mots pour me soutenir dans les moments difficiles.

Je témoigne ma profonde reconnaissance ma compagne Adeline qui me fournit un soutien inconditionnel et indispensable. A choupette qui sera bientôt parmi nous. Sa venue toute proche ma donné de la force pour avancer. Je remercie également la famille d'Adeline, avec qui je passe de bons moments, pour leur soutien.

Güet, bessere, noch bessere.

Abréviations

Acétone- d_6 :	Acétone deutéré
ADP :	Adénosine 5'-diphosphate
AMP :	Adénosine 5'-monophosphate
AMPA :	Acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AS :	Anilnamidosuccinate
ATP :	Adénosine 5'-triphosphate
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor, Facteur neurotrophique du cerveau
Bis-Q :	(E)-1,1'-(diazène-1,2-diylbis(4,1-phénylène))bis(N,N,N-triméthylméthanaminium)
BR :	Bactériorhodopsine
Bz-ATP :	Benzoyl adénosine 5'-triphosphate
CE ₅₀ :	Concentration efficace médiane
CH ₂ Cl ₂ :	Dichlorométhane
ChR :	Rhodopsine canal
ChR2 :	Rhodopsine canal de type 2
CTD :	Domaine C-terminal
D ₂ O :	Oxyde de deutérium
DENAQ :	N-(diéthylamino)azobenzène ammonium quaternaire
DIPEA :	N, N-diisopropyléthylamine
DMAP :	4-diméthylaminopyridine
DMF :	Diméthylformamide
DMSO- d_6 :	Diméthylsulfoxyde deutéré
DNQX :	6,7-Dinitroquinoxaline-2,3(1H,4H)-dione
DTT :	Dithiothréitol
EDA-ATP-MANT :	2'/3'-O-(2(2-(méthylamino)benzamido)éthyl)carbamoyl)-adénosine-5'-triphosphate
EDCI :	1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
EtOAc :	Acétate d'éthyle
FGFR3 :	Récepteur de type 3 du facteur de croissance des fibroblastes
GABA :	Acide γ -aminobutyrique
GABA _A R :	Récepteur GABA de type A

GFP :	Green fluorescence protein
GluCl :	Canaux chlore activé par le glutamate
GlyR :	Récepteur de la glycine
GP :	Ganglion plexiforme
GS :	Ganglion spinal
GT :	Ganglion trigéminé
HEK293 :	Human embryonic kidney 293
HOBt :	Hydroxydebenzotriazole
iGluR :	Récepteur ionotropique du glutamate
IP3 :	Inositol triphosphate
LBD :	Ligand binding domain, Domaine de fixation du ligand (chez iGluR)
LiAChR :	Light-gated acetylcholine receptor
LiGABA _A R :	Light-gated GABA _A receptor
LiGluR :	Light-gated ionotropic glutamate receptor
LimGluR :	Light-gated metabotropic glutamate receptor
LiP2XR :	Light-gated P2X receptor
MA :	Maléimide-azobenzène
MAACh :	Maléimide-azobenzène-acétylcholine
MAG :	Maléimide-Azobenzène-Glutamate
MAHoCh :	Maléimide-azobenzène-homocholine
MAQ :	Maléimide-azobenzène-ammonium quaternaire
ME :	Microscopie électronique
MeOH- <i>d</i> ₆ :	Méthanol deutéré
MFA :	Microscopie à force atomique
mGluR :	Récepteur métabotrope du glutamate
MTS :	Méthanethiosulfonate
nAChRs :	Récepteur nicotinique de l'acétylcholine
NMDAR :	Récepteur NMDA
NPE-ATP :	Ester de <i>P</i> ³ -(1-(2-Nitrophényl)éthyl)-adénosine 5'-triphosphate
NP _o :	Probabilité nominale d'ouverture
NTD :	Domaine N-terminal (chez iGluR)
P1 :	Récepteur purinergique de type 1
P2 :	Récepteur purinergique de type 2
P2XRs :	Récepteurs P2X
PA :	Potentiel d'action
PI3K :	Phosphatidylinositol-kinase de type 3

PPADS :	Acide pyridoxal phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonique
PPNDS :	Acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8' disulfonique)
PPSEs :	Potentiels postsynaptiques excitateurs
PTL :	Photoswitched Tethered Ligand
Q-Br :	(E)-1-(4-((4-(bromométhyl)phényl)diazenyl)phényl)-N,N,N- triméthylméthanaminium
RCPGs :	Récepteurs couplés aux protéines G
RMN :	Résonance magnétique nucléaire
SPARK :	Synthetic Photozomerisable Azobenzene-Regulated K
TFA :	Acide trifluoroacétique
THF :	Tétrahydrofurane
TNP-ADP :	Trinitrophényle-ADP
TNP-AMP :	Trinitrophényle-AMP
TNP-ATP :	Trinitrophényle-ATP
TNP-GTP :	Trinitrophényle guanosine triphosphate
TrKB :	Récepteur a activé tyrosine kinase
ZAC :	Canal activé par le zinc
α,β -meATP :	α,β -méthylène adénosine 5'-triphosphate
β,γ -meATP :	β,γ -méthylène adénosine 5'-triphosphate
δ :	Déplacement chimique, en ppm
ε :	Coefficient d'extinction molaire, en $\text{cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$
2-meSATP :	2-(méthylthio)adénosine 5'-triphosphate
5-HT ₃ Rs :	Récepteur de la sérotonine de type 3

Sommaire

Résumé	2
1. Introduction	4
2. Les récepteurs purinergiques de type P2X	7
2.1. Généralités sur les récepteurs P2X	7
2.2. Physiopathologie des récepteurs P2X	10
2.2.1. Implication des récepteurs P2X dans la nociception et la douleur neuropathique	11
2.2.2. Rôle neuromodulateur des récepteurs P2X	14
2.3. Pharmacologie des récepteurs P2X	15
2.4. Structure des récepteurs P2X	24
3. Intégration de la lumière pour l'étude des récepteurs P2X	32
3.1. Optogénétique <i>versus</i> pharmacologie optogénétique	34
3.1.1. L'optogénétique : Les Rhodopsines	35
3.1.2. La pharmacologie optogénétique	40
3.1.2.1. Principe de fonctionnement	40
3.1.2.2. Les différentes protéines transmembranaires contrôlées par la lumière. 44	
3.1.2.2.1. Les canaux potassiques.....	44
3.1.2.2.2. Les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR).....	45
3.1.2.2.3. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine et du GABA _A	50
3.1.2.2.4. Les récepteurs métabotropiques du glutamate.....	52
4. Objectif de thèse et stratégies déployées.	54
5. Identification du site fixation de l'ATP sur les récepteurs P2X.	55
Article 1	60
6. Elucidation du mécanisme d'ouverture des récepteurs P2X.	73
Article 2	79
7. Outils optogénétiques pour la photorégulation de l'activité des récepteurs P2X.	91
7.1. Vers un dérivé d'ATP photoisomérisable.	91
7.1.1. Contexte.....	91
7.1.2. Stratégie.....	91
7.1.3. Matériel et méthodes.....	92
7.1.4. Résultats.	102
7.1.4.1. Choix du point de modification de l'ATP.....	102
7.1.4.2. Bioinformatique et choix d'un dérivé 2',3' de l'ATP.	106
7.1.4.3. Synthèse organique d'un dérivé 2',3' de l'ATP.....	108
7.1.4.4. Discussions et perspectives.	110
7.2. Agrafe moléculaire photoisomérisable.	112
7.3. L'Optogate, une nouvelle approche optogénétique chimique.....	114
Article 3	122
8. Conclusions générales et perspectives.	137
Annexes	139
Article 4	140
Article 5	174
Bibliographie	179

Résumé

L'optogénétique pharmacologique est une technologie qui a démontré sa puissance en permettant le contrôle optique du comportement animal par l'intermédiaire du photocontrôle de l'activité neurale. Cette stratégie aussi connue sous le nom de « photoswitched tethered ligand » (PTL), consiste à modifier génétiquement un récepteur canal en substituant un résidu à proximité du site de liaison du ligand par une cystéine pour attacher un « photoswitch » thiol-réactif sur le récepteur. Le photoswitch porte un groupement azobenzène connu pour s'interconvertir réversiblement, sous l'action de la lumière, entre un isomère *trans* étendu et un isomère *cis* plié. Ce changement de géométrie permet de contrôler la position relative du ligand et de l'éloignant ou de le présenter à son site de liaison, afin d'activer ou d'inactiver le récepteur en fonction de la longueur d'onde d'illumination. La stratégie PTL a démontré sa polyvalence en assurant le contrôle optique de nombreuses protéines transmembranaire allant des canaux potassiques, aux récepteurs nicotinique de l'acétylcholine en passant par les récepteurs ionotropiques du glutamate. A ce jour, cette stratégie n'a pas été appliquée aux récepteurs P2X (P2XR).

L'objectif de ces travaux de recherche est de développer des outils optochimiques pour contrôler l'activité des récepteurs P2X. Pour cela, la stratégie des PTLs a été envisagée. Au début de cette étude nous disposions uniquement de la structure cristallographique de zfP2X4 dans un état fermé sans ATP. La localisation du site ATP restait spéculative en l'absence d'identification directe.

Dans une première série d'expérience nous avons définitivement localisé le site ATP, par marquage d'affinité, à l'interface de deux sous-unités adjacentes dans une large cavité extracellulaire. Nous avons marqué deux résidus éloignés de ~18 Å à l'aide d'un analogue de l'ATP thiol-réactif, le NCS-ATP, suggérant l'existence d'au moins deux modes de fixation de l'ATP. Le marquage de l'une de ses positions n'assurant pas l'ouverture du canal de lui même, potentialise ultérieurement la réponse ATP, tandis que le marquage de l'autre résidu bloque le récepteur dans un état inactif.

Dans un second temps nous avons démontré, en alliant des expériences de bioinformatique à des expériences d'ingénierie de site zinc, que la fermeture du site ATP, suite à la fixation d'un agoniste, entraîne l'ouverture du canal.

Forts de ces précédentes études nous commençons à développer la stratégie PTL sur les récepteurs P2X. Les tentatives de synthèse d'un photoswitch analogue de l'ATP ont échouées. Face à ces difficultés nous avons développé, sur P2X2R, une stratégie originale et alternative nommée optogate. Cette approche nous a permis de reprogrammer la porte du canal pour photosensibiliser P2XR. Nous avons trouvé que la modification covalente du canal, par une molécule synthétique contenant un azobenzène, permet de l'ouvrir et de le fermer rapidement et réversiblement avec la lumière sans utiliser d'ATP. Finalement, nous avons créé un véritable « light-gated P2X receptor » (LiP2XR), insensible à l'ATP, capable de photoréguler l'activité neuronale. L'optogate fournit un outil puissant, dépourvu de sensibilité endogène, pour l'étude du rôle physiologique de P2XR dans des conditions physiologiques et pathologiques. Ces découvertes ouvrent une nouvelle voie pour activer spécifiquement les autres canaux ioniques indépendamment de leur stimulus naturel.

Mots clés : P2XR, optogénétique, photoswitch, azobenzene.

1. Introduction

Les cellules eucaryotes sont dotées d'une architecture complexe avec des compartiments cellulaires délimités par des membranes lipidiques qui assurent leur intégrité et leur bon fonctionnement. Ces compartiments isolés les uns des autres ont besoin de communiquer pour se synchroniser et agir de concert, pour tout simplement assurer la vie de la cellule. Ce niveau de complexité s'accroît à l'échelle d'un organisme où chaque groupe de cellules remplit une fonction propre. C'est ainsi que la communication intercellulaire prend toute son importance. Les altérations de cette communication sont à l'origine de nombreuses pathologies, d'où l'intérêt d'en connaître les rouages.

Les récepteurs canaux jouent un rôle central dans la communication intercellulaire. En effet, ces protéines transmembranaires sont à l'origine de la transmission de l'influx nerveux au sein des systèmes nerveux centraux et périphériques. Le contrôle de ces cibles constitue un enjeu majeur pour comprendre leur degré d'implication dans des phénomènes biologiques physiologiques ou pathologiques. Cette compréhension est nécessaire à l'élaboration de stratégies pour enrayer toute atteinte pathologique. Nous révélerons au cours des chapitres suivants les limites de la pharmacologie conventionnelle dans l'étude des rôles physiologiques des récepteurs canaux, au travers des récepteurs P2X. Ensuite, nous verrons en quoi la lumière est une alternative puissante pour le contrôle des récepteurs canaux. Mais avant cela, définissons ce que sont les récepteurs canaux.

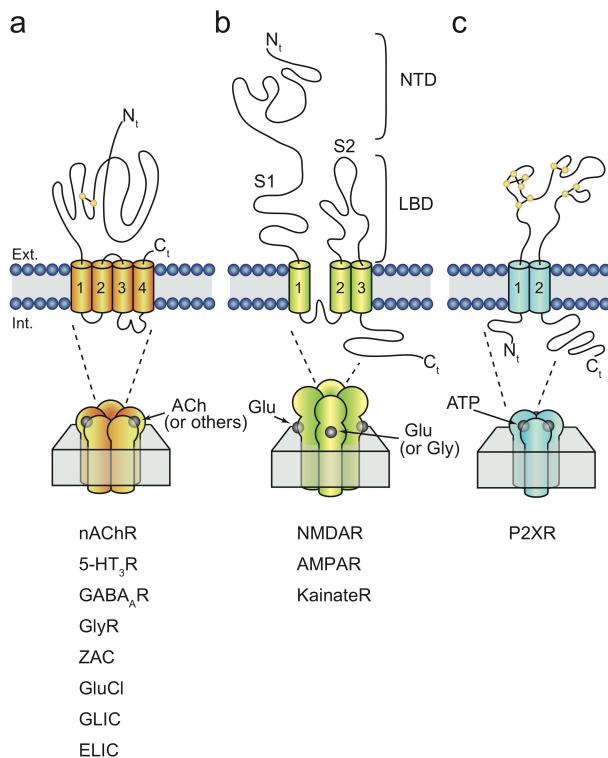


Figure 1. Représentation schématique des trois familles de LGICs. (a) Les récepteurs cys-loop, (b) iGluRs et (c) P2XRs. Les résidus cystéine engagés dans des ponts disulfures sont représentés par des cercles dorés. Ext. et Int. signifient extracellulaire et intracellulaire. (Lemoine et al 2012).

Les récepteurs canaux se répartissent en trois superfamilles qui se distinguent par leur architecture (Fig. 1).

La première superfamille est celle des récepteurs pentamériques, communément appelée la famille des récepteurs « cys-loop » du fait de la présence de deux résidus cystéine canoniques, engagés dans un pont disulfure intra-sous-unité. Ce pont disulfure extracellulaire est localisé dans une boucle d'environ treize acides aminés. Les récepteurs pentamériques ont un domaine transmembranaire constitué de quatre hélices- α (M1 - M4), les extrémités N- et C-terminales sont extracellulaires. Le C-terminal est court, tandis que le domaine extracellulaire N-terminal, contenant le site de fixation du ligand, est formé de ~200 acides aminés. Le canal ionique est, quant à lui, constitué de l'association de cinq hélices- α M2. Cette superfamille regroupe les récepteurs cation-sélectifs excitateurs comprenant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs), les récepteurs 5-HT₃ (5-HT₃Rs), ainsi que les récepteurs activés par le zinc (ZAC), et les récepteurs inhibiteurs anion-sélectifs représentés par les récepteurs du GABA (GABA_AR), les récepteurs de la glycine (GlyR) et les canaux chlore activés par le glutamate (GluCl) des invertébrés (Baenziger & Corringer 2011, Miller & Smart 2010, Thompson et al 2010).

La seconde superfamille est celle des récepteurs ionotropiques du glutamate qui comprend les récepteurs excitateurs NMDA, AMPA et kainate, nommés en fonction de leur agoniste de référence (Mayer 2005). Ces récepteurs ont une architecture tétramérique. Chaque sous-unité est constituée d'un domaine régulateur N-terminal (NTD), d'un domaine de fixation du ligand (LBD), d'un domaine transmembranaire constitué de trois hélices- α (M1 - M3) et d'un domaine intracellulaire C-terminal (CTD). Le canal est défini par l'association de quatre boucles P hydrophobes situées entre M1 et M2 de chaque sous-unité.

La dernière superfamille est celle des récepteurs trimériques à laquelle appartiennent les récepteurs purinergiques P2X (P2XRs)(Jarvis & Khakh 2009). Les récepteurs P2X, activés par l'adénosine-5'-triphosphate (ATP), sont constitués de sept sous-types différents (P2X1-P2X7). Chaque sous-unité adopte une architecture relativement simple avec les segments N- et C-terminaux intracellulaires suivis du domaine transmembranaire composé de deux hélices- α (TM1 et TM2) reliées par un large domaine extracellulaire riche en pont disulfure qui contient le site de fixation de l'ATP. Le canal est délimité par trois hélices- α TM2. (Lemoine et al 2012).

Les récepteurs canaux ont un principe d'activation commun. La liaison d'un neurotransmetteur à son site de fixation (binding) entraîne, de manière allostérique, l'ouverture rapide du canal ionique (gating) qui laisse passer les ions au travers de la membrane. Le flux d'ion peut entraîner la dépolarisation, comme c'est le cas des iGluR, ou l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire, provoqué par les GABA_AR par exemple, et donc générer ou inhiber des potentiels d'action. D'autres canaux, tels que P2X, laissent rentrer les ions calciques dans la cellule. Le calcium est un second messager qui déclenche une cascade de modulation allant de l'exocytose calcium dépendante à la mort cellulaire.

Focalisons nous sur les récepteurs P2X, une cible d'intérêt au potentiel sous-estimé.

2. Les récepteurs purinergiques de type P2X

2.1. Généralités sur les récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont constitués de sept sous-types différents, P2X1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7, qui s'assemblent pour former des homotrimères et des hétérotrimères. Notons que les homotrimères P2X6 souffrent d'une mauvaise expression de surface (Collo et al 1996). Les sous-unités ont une taille comprise entre 379 (P2X6) et 595 (P2X7) acides aminés (Khakh & North 2012) avec une homologie de séquence comprise entre 40 et 55% (North 2002).

Chacun des sous-types se distingue par sa sensibilité pour les agonistes (cf. Table 2.) et ses taux d'activation et d'inactivation (Fig. 2). P2X1R et P2X3R présentent une désensibilisation très rapide, tandis que P2X2R et P2X4R désensibilisent lentement.

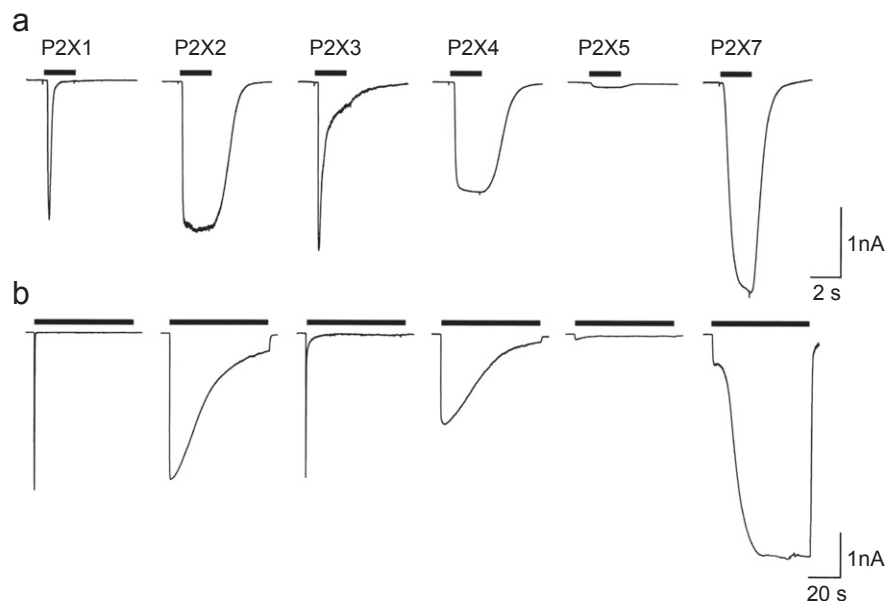


Figure 2. Désensibilisation rapide (haut) et lente (bas) de P2XR homomériques de rat. Les récepteurs sont exprimés dans les cellules HEK293. (a) Seuls les récepteurs P2X1 et P2X3 ont des profils de désensibilisation rapide lors d'une application rapide (2 s) d'ATP à 30 μ M (1mM ATP pour P2X7 compte tenu de sa faible sensibilité, cf. table 2). (b) Lors d'une application prolongée (60 s) d'ATP à 30 μ M (1mM ATP pour P2X7), une désensibilisation lente est observée pour les récepteurs P2X2 et P2X4. Dans tous les cas, sauf pour P2X7, les réponses indiquées sont observées lors de la première application d'ATP sur la cellule, pour P2X7, une incubation de 2 min précède l'enregistrement. Notons, pour P2X7, la réponse biphasique reflétant une dilatation du pore associée à la seconde phase plus lente. (North 2002).

Les récepteurs P2X, dit cations non-sélectifs, laissent passer les cations allant des petits cations inorganiques tel le sodium aux larges cations organiques tel le NMDG. P2X5R ont aussi la propriété d'être perméables au chlore. Prenons l'exemple de P2X2R. Typiquement, les récepteurs P2X2 sont perméables aux cations alcalins avec la séquence de perméabilité suivante, $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$, et sont imperméables aux cations organiques tels le $NMDG^+$, le $Tris^+$, le TMA^+ et le TEA^+ (Fig. 3). Les cations divalents, quant à eux, bloquent le canal. Les constantes de dissociation (K_d) de ces cations, relatant leur affinité pour le canal, sont en corrélation avec leur rayon de Stockes. La séquence des K_d est $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Ca^{2+} > Ba^{2+}$. (Ding & Sachs 1999a).

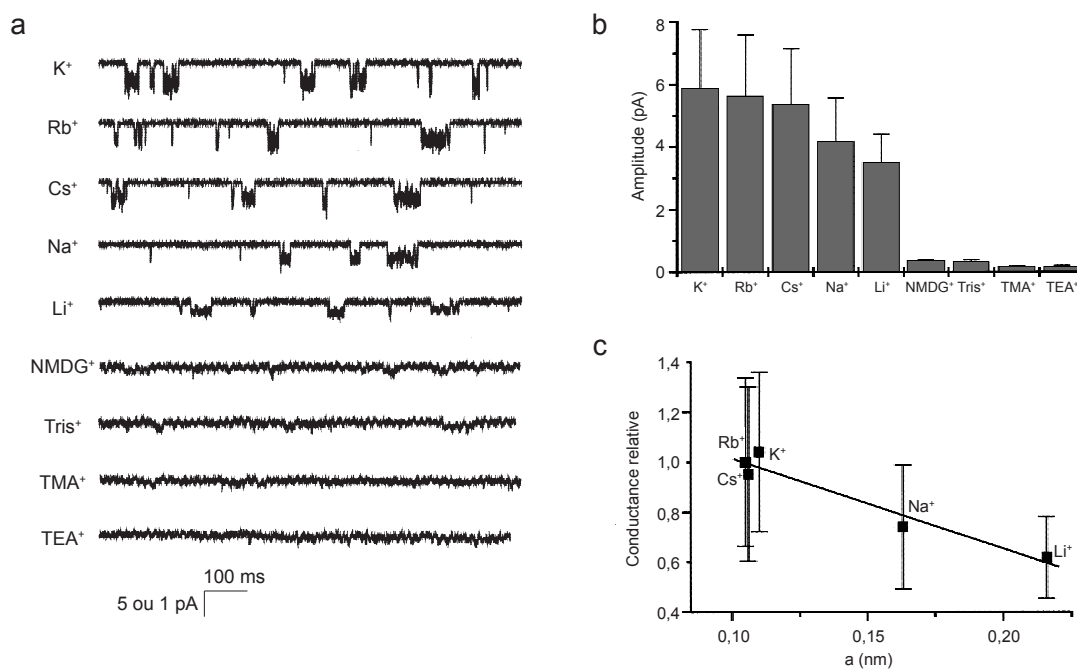


Figure 3. Effet d'ions perméants sur les courants de single channel. (a) Courants électrophysiologiques en mode canal unique en configuration outside-out sur des cellules HEK 293 à -120 mV en présence de différents cations. Les courants sont produits par 2 μM d'ATP. Les ouvertures en présence de cations organiques sont pour la plupart non visible à cause de leur faible amplitude. Notez que l'échelle pour l'amplitude des courants est de 5 pA pour les ions métalliques et de 1 pA pour les cations organiques. (b) histogramme résumant l'amplitude des courants en canal unique en fonction des cations. (c) La séquence de perméabilité $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > Li^+$ respecte la corrélation entre la conductance relative des ions métalliques en canal unitaire et le rayon de Stockes ($r = 0,97$). Les barres d'erreur importantes sont inhérentes à l'excès de bruit causé par les ouvertures du canal. (Ding & Sachs 1999a)

Les récepteurs P2X et notamment P2X2R, P2X4R et P2X7R, ont la particularité de passer à un état dilaté, ou de conductance I_2 , lors d'une application prolongée d'ATP (plusieurs secondes). Cet état I_2 permet le passage de larges cations organiques comme le NMDG et le YO-PRO (Fig. 4). La dilatation de P2X7 induit une large gamme de réponses cellulaires allant de la libération de cytokines inflammatoires à la mort cellulaire (Ferrari et al 2006, Gandelman et al 2013). La dilatation de P2X4 s'opérant dans les cellules gliales ne cause pas la mort cellulaire mais elle serait impliquée dans les douleurs neuropathiques (Bernier et al 2012).

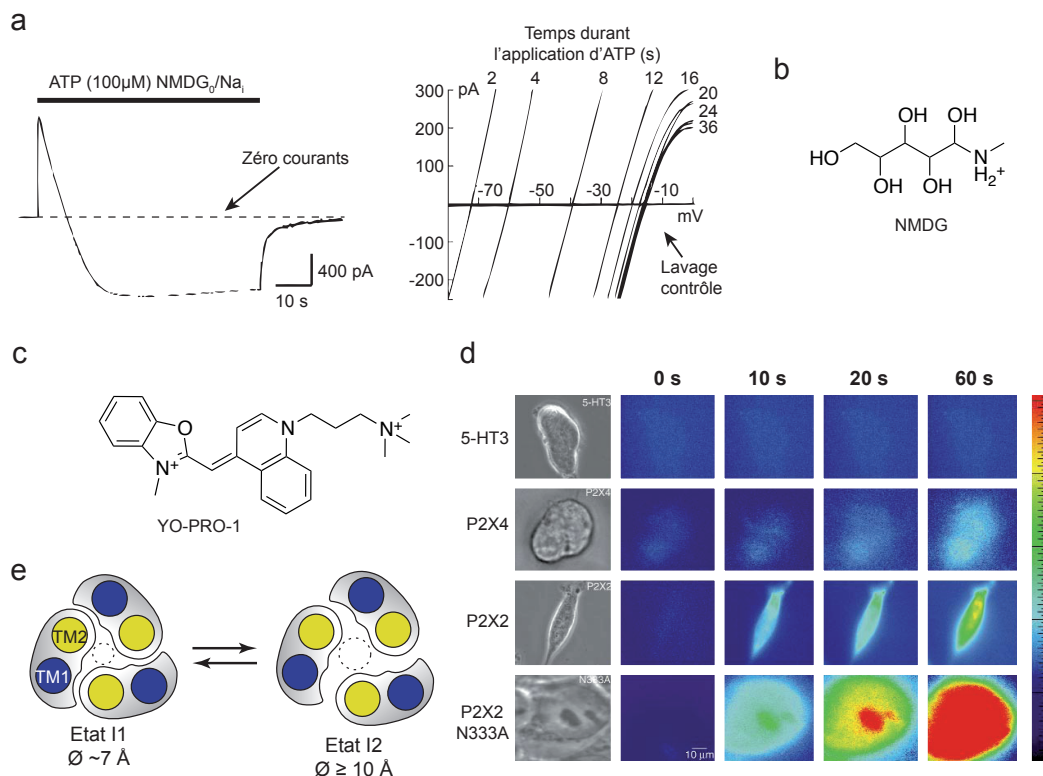


Figure 4. Dilatation des récepteurs P2X2 exprimés dans les cellules HEK 293. (a) Une application prolongée d'ATP entraîne une augmentation rapide de la perméabilité au NMDG^+ des récepteurs P2X2. A gauche, protocole. A droite, relation courant voltage montrant l'évolution du potentiel d'inversion du NMDG vers des valeurs positives, témoignant de la dilatation du canal. (b) et (c) Structures moléculaires du NMDG et du YO-PRO-1, respectivement. (d) Expériences d'incorporation du YO-PRO-1 dans des cellules. (e) Représentation schématisée de la dilatation des récepteurs P2X (« gating model »). (Virginio et al 1999).

2.2. Physiopathologie des récepteurs P2X

Les récepteurs P2X sont exprimés dans de nombreux tissus et sont responsables d'une pléiade d'effets physiologiques (Burnstock 2008, Burnstock 2009, Fields & Burnstock 2006, Surprenant & North 2009), résumés dans la Table 1. La transmission de l'influx nerveux au sein du cerveau passe par le déclenchement de potentiels postsynaptiques excitateurs (PPSEs). La création de PPSEs provoqués par l'activation des récepteurs P2X au niveau central reste controversée, en raison de l'utilisation d'agonistes et d'antagonistes non sélectifs. A cela s'ajoute l'absence d'utilisation de souris knock-out pour confirmer l'implication des récepteurs P2X. Plus qu'un rôle direct dans la transmission de l'influx nerveux dans le cerveau, les récepteurs P2X sont impliqués dans la neuromodulation (Khakh & North 2012). Cependant, le déclenchement de PPSEs induits par P2X au niveau périphérique est clairement établi. La nociception en est le meilleur exemple (Lemoine et al 2012, Wirkner et al 2007).

Type de récepteur	Localisation	Fonctions principales
P2X ₁	Muscles lisses, plaquettes, cervelet, neurones de la corne dorsale de la moelle épinière	Contraction des muscles lisses Activation plaquettaire
P2X ₂	Muscles lisses, SNC, rétine, cellules chromaffines, ganglions autonomes et sensoriels	Transmission sensorielle Modulation des fonctions synaptiques
P2X ₃	Neurones sensoriels, neurones du noyau du tractus solitaire, quelques neurones sympathiques	Médiation de la transmission sensorielle Facilite la libération de glutamate dans le SNC
P2X ₄	SCN, testicules, colon	Modulation de l'inflammation chronique Modulation de la douleur neuropathique
P2X ₅	cellules en prolifération de la peau, de l'intestin, de la vessie, du thymus et de la moelle épinière	Inhibition de la prolifération cellulaire Augmentation de la différenciation cellulaire
P2X ₆	SNC, motoneurones de la moelle épinière	Fonctionne comme un récepteur hétéromérique en combinaison avec les sous unités P2X ₂ et P2X ₄
P2X ₇	Cellules apoptotiques du système immunitaire, du pancréas et de la peau, par exemple	Médiation de l'apoptose Prolifération cellulaire Libération de cytokines pro inflammatoires

Table 1. Distribution et fonction des récepteurs P2X. (Burnstock 2008).

En dépit de la large distribution des récepteurs P2X dans l'organisme, de multiples souris knock-out (P2X₁, 2, 3, 2/3, 4, 7) arrivent à l'âge adulte. Ces

récepteurs ne sont donc pas requis pour la viabilité de l'animal, toutefois, ces souris souffrent d'altérations pathologiques de voies de signalisation. Une délétion de P2X1 abolit la contraction du canal déférent, ce qui entraîne une infertilité chez la souris mâle (Mulryan et al 2000). Les récepteurs P2X2 et P2X2/3 sont impliqués dans les douleurs persistantes. P2X3 joue un rôle dans la perception de la douleur aiguë (Cockayne et al 2005, Cockayne et al 2000). Une délétion de P2X4 provoque une surdité et entraîne des troubles du spectre autistique, probablement causés par une altération de l'expression des récepteurs du glutamate NMDA et AMPA (Wyatt et al 2013). Suite à une lésion nerveuse périphérique la surexpression de P2X4 dans les cellules microgliales de la moelle épinière est à l'origine de douleurs neuropathiques (Ulmann et al 2008). Les récepteurs P2X7 responsables de la libération d'interleukine (IL-1 β) sont à l'origine d'inflammation et de douleurs chroniques (Chessell et al 2005).

Nous allons aborder en détail la nociception, l'altération pathologique de cette voie de signalisation responsable de douleurs neuropathiques et nous finirons par le rôle neuromodulateur des récepteurs P2X.

2.2.1. Implication des récepteurs P2X dans la nociception et la douleur neuropathique

Nociception.

L'ATP extracellulaire est le premier messager de la douleur. Ce médiateur peut être libéré par de nombreux types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les hépatocytes et les chondrocytes. La libération d'ATP dans le milieu extracellulaire est consécutive à un dommage cellulaire, une distension mécanique, un stress thermique ou même une stimulation pharmacologique (moins documentée) (Lazarowski et al 2003). Plusieurs populations de neurones sont impliquées dans la nociception pour les différentes parties du corps humain. Les neurones du ganglion spinal (GS) innervent la périphérie du corps (peau et muscles) et les organes sous-diaphragmatiques, les neurones du ganglion plexiforme (GP) innervent les organes sus-diaphragmatiques

tandis que les neurones du ganglion trigéminal (GT) innervent la face. Nous allons explorer la voie nociceptive au travers des neurones du GS (Fig. 5).

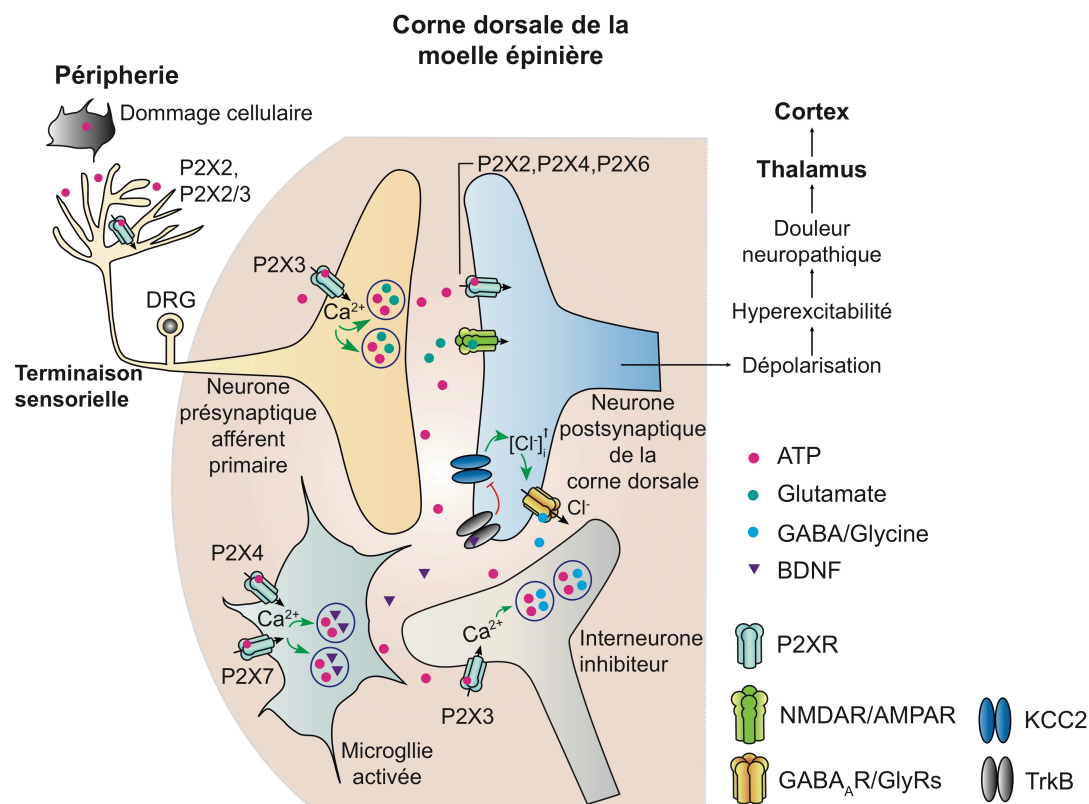


Figure 5. Nociception et douleur neuropathique. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la transmission de la douleur impliquant les LGICs dans le système nerveux et la moelle épinière. L'atteinte pathologique de cette voie de signalisation entraîne des douleurs neuropathiques. Pour plus d'informations cf. 2.2.1. (Lemoiné et al 2012).

L'ATP déchargé dans le milieu extracellulaire active les récepteurs P2X3, P2X2/3 et P2X2 présents sur les terminaisons nerveuses des fibres sensibles. L'activation des récepteurs P2X entraîne la dépolarisation de la membrane, créant un potentiel d'action qui se propage le long du neurone présynaptique. Il en résulte la colibération de glutamate et d'ATP au niveau de la corne dorsale de la moelle épinière. Dans une boucle de rétrocontrôle positive, l'ATP active les récepteurs P2X présynaptiques, faisant accroître la concentration calcique intracellulaire et augmenter l'exocytose, calcium-médiée, de glutamate. Le glutamate, quand à lui, active les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR) du neurone postsynaptique de la corne dorsale de la moelle épinière provoquant sa dépolarisation qui conduit le message de douleur au cerveau. L'arrêt de la transmission de la douleur au cerveau se fait par l'intermédiaire

des interneurones inhibiteurs, sécréteurs de GABA. La libération de GABA active les récepteurs GABA_A, responsables d'un flux entrant de chlore, qui hyperpolarise les neurones postsynaptiques de la corne dorsale, pour finalement stopper le signal de douleur. Une dérégulation de cette voie de rétrocontrôle négatif est responsable de douleurs chroniques ou neuropathiques (Lemoine et al 2012).

Douleur neuropathique.

Une lésion nerveuse entraîne l'activation de la microglie dans la corne dorsale de la moelle épinière (Fig. 5). En réponse à la lésion, les cellules microgliales surexpriment les récepteurs P2X4 et P2X7. Des données immunohistochimiques révèlent l'expression de ces deux récepteurs dans les cellules microgliales entourant les zones de lésion et de neurodégénérescence dans le cerveau (Parvathenani et al 2003). L'activation des récepteurs P2X4 et P2X7 par l'ATP diffusant hors de la fente synaptique, provoque la libération du facteur neurotrophique issu du cerveau, le « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF). Le BDNF active les récepteurs à activité tyrosine kinase, TrkB, qui inhibent l'expression du co-transporteur potassium-chlore KCC2 au niveau du neurone postsynaptique de la corne dorsale. La concentration intracellulaire en chlore augmente et provoque l'inversion du courant chlore induit par le GABA libéré par l'interneurone inhibiteur. Les canaux GABA sont alors responsables d'un courant chlore sortant, ce qui a pour conséquence de dépolariser la membrane, provoquant une hyperexcitabilité du neurone postsynaptique de la corne dorsale. Cette hyperexcitabilité neuronale est responsable de la douleur neuropathique (Bernier et al 2012, Chessell et al 2005, Coull et al 2005, Inoue et al 2004, Jarvis 2010, Lemoine et al 2012, Tsuda et al 2003).

2.2.2. Rôle neuromodulateur des récepteurs P2X

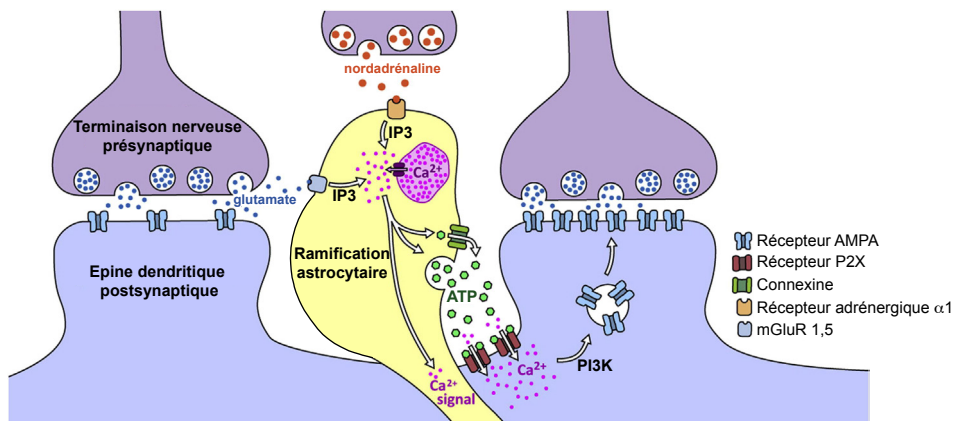


Figure 6. Mécanisme de synaptic scaling impliquant les récepteurs P2X dans les neurones magnocellulaires. Pour plus de détail se référer au texte ci-dessous. (Khakh & North 2012).

L'exemple le plus documenté sur la neuromodulation médiée par les récepteurs P2X est la régulation de la taille des synapses (« synaptic scaling ») chez les neurones magnocellulaires de l'hypothalamus (Fig. 6). Le « synaptic scaling » est un mécanisme de recrutement de récepteurs canaux permettant d'augmenter la capacité de dépolarisation du neurone au niveau de ses synapses. Les prolongements astrocytaires agissent comme des senseurs jouant un rôle clé dans la neuromodulation impliquant les récepteurs P2X. La noradrénaline, sécrétée par les cellules neurosécrétrices de l'hypothalamus, ainsi que le glutamate, libéré par les neurones postsynaptiques afférents, provoquent l'augmentation du calcium intracellulaire dans les astrocytes, par l'intermédiaire de l'inositol triphosphate (IP3) produit suite à l'activation des récepteurs adrénergiques $\alpha 1$ et des récepteurs métabotropiques du glutamate. Les cellules astrocytaires libèrent de l'ATP qui active les récepteurs P2X (P2X2, P2X4 et P2X7) et fait entrer du calcium dans les neurones magnocellulaires. Le calcium active la phosphatidylinositol-kinase de type 3 (PI3K), augmentant la densité de récepteurs AMPA au niveau postsynaptique (Gordon et al 2005, Gordon et al 2009, Khakh & North 2012).

2.3. Pharmacologie des récepteurs P2X

Les outils pharmacologiques sont les plus utilisés pour disséquer les effets physiologiques d'une cible biologique et pour prouver l'existence de cette cible dans un type cellulaire donné. Cette stratégie est étroitement dépendante de l'existence de molécules sélectives de la cible étudiée. Cependant, aucune molécule n'est spécifique d'une cible biologique, il suffit d'augmenter la concentration appliquée pour observer des effets secondaires dus à l'activation d'autres cibles. « Toute substance est un poison et aucune n'est inoffensive. C'est simplement la dose qui fait qu'une substance n'est pas toxique. », *Paracelse*. La sélectivité dépend donc de la dose permettant d'activer une cible plutôt qu'une autre. Classiquement une molécule est considérée comme sélective d'une cible 1 par rapport à une cible 2 si le rapport entre les concentrations effectrices 50% pour chacune des cibles (CE_{502}/CE_{501}) est supérieur ou égal à 100, c.-à-d. deux unités logarithmiques (Landry & Gies 2003).

Nous verrons dans ce chapitre les molécules actives sur P2X (agonistes, antagonistes, modulateurs allostériques) décrites dans la littérature sans faire de liste exhaustive. Nous nous cantonnerons aux molécules ayant une forte affinité apparente pour P2X. La figure 7 présente les structures des molécules abordées dans le texte. En fin de chapitre, un tableau résume les effets de nombreuses molécules sur P2X en les classant par agonistes, antagonistes et modulateurs allostériques (table 2). La pharmacologie des récepteurs P2X est décrite de manière détaillée par Kenneth A. Jacobson et Claudio Coddou (Coddou et al 2011, Jacobson et al 2002) et de manière résumée par Diana Donnelly-Roberts, Michel F. Jarvis et R. Alan North (Donnelly-Roberts et al 2008, Jarvis & Khakh 2009, North & Jarvis 2013). En 2012, nous avons publié une revue qui décrit, entre autres, la pharmacologie des récepteurs P2X sous un angle structural en incorporant les acides aminés impliqués dans la reconnaissance des ligands (Lemoine et al 2012)(cf. annexes article 4).

Les Agonistes.

L'ATP constitue l'agoniste endogène des récepteurs P2X. Ce neurotransmetteur est un agoniste, non sélectif de P2X d'efficacité variable (CE_{50} de l'ordre du micromolaire à la centaine de millimolaire), connu pour activer d'autres cibles tels les récepteurs métabotropiques P2Y (P2Y₂, P2Y₄ et P2Y₁₁) (Wildman et al 2002). Une fois libéré dans le milieu extracellulaire, l'ATP est transformé en ADP, AMP et adénosine par des ectonucléotidases (Jacobson et al 2002). L'ADP active les récepteurs métabotropiques P2Y (P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃) (Wildman et al 2002). L'adénosine, quant-à-elle, active les récepteurs purinergiques de type 1 (P1) (Jacobson et al 2002).

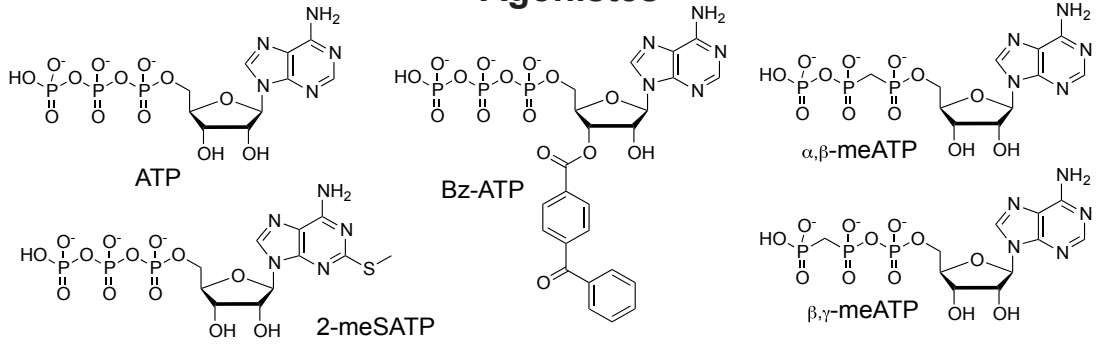
Face au manque de sélectivité de l'ATP, différents analogues de l'ATP ont été testés sur les récepteurs P2X.

Modifications au niveau des phosphates. Parmi ces agonistes, l' α,β -méthylène ATP (α,β -meATP) et le β,γ -méthylène ATP (β,γ -meATP) sont des bioisostères de l'ATP, dans lesquels l'atome d'oxygène entre les phosphates correspondant est remplacé par un groupement méthylène. Cette substitution a pour conséquence de diminuer la dégradation de ces bioisostères par les ectonucléotidases. L' α,β -meATP et le β,γ -meATP ne sont pas actifs sur P2Y et sont plus efficaces sur P2X1, P2X3, P2X2/3 et P2X5 (CE_{50} de l'ordre du micromolaire pour l' α,β -meATP et de la dizaine de micromolaire pour le β,γ -meATP).

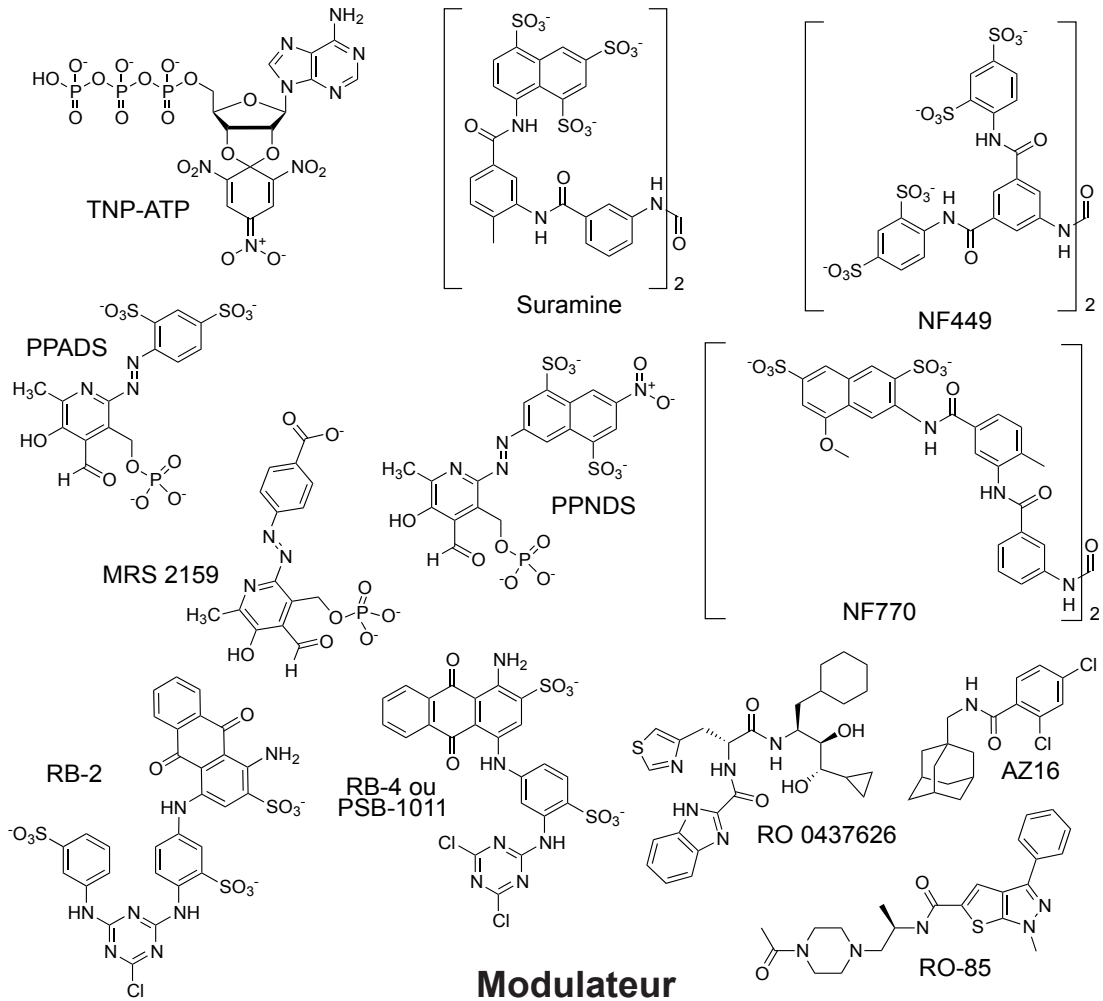
Modification au niveau de l'adénine. Le 2-meSATP, souvent plus efficace que l'ATP (CE_{50} de l'ordre du micromolaire), est un agoniste entier des récepteurs P2X et P2Y. L'incapacité du 2-meSATP à activer les récepteurs de l'adénosine fit de cette molécule un outil important pour révéler l'existence de ces deux familles de récepteurs (Coddou et al 2011).

Modification au niveau du ribose. Le Bz-ATP est un agoniste P2X qui n'active pas P2Y, à l'exception de P2Y₁₁ et P2Y₁₃. Remarquablement cet agoniste possède une affinité apparente beaucoup plus forte que celle de l'ATP pour P2X7 (CE_{50} de 10 μ M contre 3 mM respectivement).

Agonistes



Antagonistes



Modulateur

Figure 7. Structure chimique de quelques agonistes, antagonistes et modulateur allostérique de P2XR.

Face au manque de sélectivité des agonistes pour un sous-type P2X, l'assignement d'un rôle fonctionnel de ces récepteurs, dans des tissus intacts, dépend de manière critique de l'utilisation d'antagonistes (Virginio et al 1998b).

Les antagonistes.

Dérivé d'ATP. Nous commençons par le trinitrophényle-ATP (TNP-ATP), un analogue fluorescent de l'ATP, dans lequel les hydroxyles du ribose sont connectés au cycle trinitrophényle par un atome de carbone spiro. Le TNP-ATP est le premier antagoniste non-sélectif à agir sur P2X1, P2X3 et P2X2/3 avec une affinité de l'ordre du nanomolaire. Sur les mêmes récepteurs, d'autres dérivés de nucléotides (TNP-ADP, TNP-AMP et TNP-GTP) sont des antagonistes efficaces (Virginio et al 1998b). Cependant le TNP-ATP est rapidement métabolisé, limitant son utilisation comme antagoniste fonctionnel (Lewis et al 1998).

Composés organiques. Les analogues de la suramine sont des urées symétriques polysulfatées de haut poids moléculaire ($\sim 1300 \text{ g.mol}^{-1}$, pour la suramine). La suramine est active sur une multitude de cibles incluant la transcriptase-inverse du virus de l'immunodéficience humaine, les récepteurs couplés à la protéine G et de multiples sous-types de récepteurs purinergiques de type 2 (P2). L'analogue de la suramine le plus efficace sur P2X est le NF449 (NF449>NF279>NF023). Cet analogue de la suramine est, dans l'état des connaissances, un inhibiteur compétitif sélectif de P2X1. Contrairement à ce que laisse penser Claudio Coddou (Coddou et al 2011), les effets inhibiteurs du NF449 sur les protéines G_s et la voie de signalisation du récepteur de type 3 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR3) n'interfèrent pas avec ceux sur P2X1 car ils interviennent à des concentrations élevées ($\sim 6 \mu\text{M}$ et $\geq 100 \mu\text{M}$ contre 0,05-500 nM pour P2X1) (Hohenegger et al 1998, Krejci et al 2010). De plus, il a été mis en évidence que le NF449 réduit l'agrégation plaquettaire, dans un modèle de thromboembolisme chez la souris, en association avec le blocage de la fonction du récepteur P2X1 (Hechler et al 2005). Le NF770, en partie mis au point par une analyse structurale de P2X4, est un composé prometteur pour aller vers un antagoniste sélectif de P2X2 (composé testé uniquement sur des P2X) (Wolf et al 2011).

Une autre classe d'antagonistes regroupe les dérivés du pyridoxal de phosphate. Parmi eux, le PPADS est connu pour agir comme un inhibiteur non sélectif. Le PPNDS est plus sélectif de P2X par rapport à P2Y. Le MRS2159 est un chef de file prometteur pour aller vers un antagoniste sélectif de P2X1.

Au sein des analogues de l'antraquinone, le « reactive blue 2 » (RB-2) est un antagoniste non sélectif de P2X qui n'est pas capable de discriminer entre P2X et P2Y (Ralevic & Burnstock 1998). Le PSB-1011, connu aussi sous le nom de « reactive blue 4 » (RB-4) est un antagoniste qui discrimine P2X de P2Y et qui est plus efficace sur P2X2 (Baqi et al 2011).

Nous passons à une classe d'antagonistes « exotiques » dans le sens où leurs structures sont originales et ouvrent la voie vers d'autres molécules sélectives de P2X. Le premier nommé AstraZeneca16 (AZ16, pour le nom de l'entreprise et le numéro du composé) est un dérivé adamantane. L'AZ16 est un antagoniste compétitif présentant une affinité de l'ordre du nanomolaire pour P2X7 (Baxter et al 2003). Les deux derniers sont des composés identifiés par Roche. Le RO 0437626 est un point de départ pour un antagoniste sélectif de P2X1 (testé uniquement sur P2X1, P2X2, P2X3 et P2X2/3) (Jaime-Figueroa et al 2005). Le RO-85, quant-à-lui, est un antagoniste sélectif de P2X3 (Brotherton-Pleiss et al 2010).

Le passage sur les antagonistes se termine avec la paroxétine, un inhibiteur de la recapture de la sérotonine. De manière remarquable, cet antidépresseur permet de lutter contre les douleurs neuropathiques par l'intermédiaire de l'inhibition de P2X4 (Nagata et al 2009).

Classe des composés	Composés	Sous-unités, nomenclature NC-IUPHAR					
		P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
		CE ₅₀ et CI ₅₀ (µM autre spécifié)					
Nucléotides et analogues	Agonistes¹						
	ATP	0,1-0,7	2-8	1	1-10	0,5-4	2-4 mM
	2-meSATP	0,1-1	1	0,3	10-100 ^P	0,5	200 ^P
	α,β-meATP	0,1-1	>100 ^P	1-2	4-300 ^P	1-12 ^P	>300 ^P
	β,γ-meATP	2 ^P	>300 ^P	>300 ^P	>300 ^P	10 ^P	>300 ^P
	ATPγS	1 ^P	10 ^P	10 ^P	-	0,5	-
	Ap ₃ A	1,2 ^P	-	-	-	5 ^P	-
	Ap ₄ A	0,04 ^P	15	1	2-10 ^P	0,3 ^P	-
	Ap ₅ A	0,9 ^P	-	1	-	0,7 ^P	-
	Ap ₆ A	0,6	-	1,5	-	5 ^P	-
	Bz-ATP	0,7-24	6-30 ^P	N.D.	3	-	10
	CTP	8,7	-	-	200 ^P	-	-
		Antagonistes²					
	TNP-ATP	0,006	2	0,0009	15	0,6-0,7	>30
	Ip ₄ I	0,6	inactif	1	1,7	-	-
	Ip ₅ I	0,003	inactif	3	0,002	-	-
	Suramine	1-2	10	3	>300	2-3	>300
	NF023	0,2	<100	8,5-29	>100	-	-
	NF279	0,02	1	-	-	-	3-20
Suramine et analogues	NF449	0,05-500 nM	>100	>100	>100	-	40
	NF770	0,94	0,019	0,074	>10	-	>10
	NF776	N.D.	0,097	N.D.	>10	-	>10
	NF778	N.D.	0,14	N.D.	>10	-	>10
Analogues du phosphate de pyridoxal	PPADS	1	1-3	1,5	>300	0,2-0,6	10-45
	PPNDS	0,015	-	-	-	-	0,4-11
	MRS2220	10	100 pas d'effet	60	100 pas d'effet	-	-
	MRS2159	0,009	-	0,15	-	-	2-19
	MRS2257	0,01	0,3	0,03	-	-	-
Analogues de la triméthoprimine	RO-4 ou AF-353	>100	>100	0,1-0,009	>100	>100	>100
	RO-3	>10	>10	0,01	>10	>10	>10
	RO-51	>10	>10	0,002	>10	>10	>10

Analogues de l'antraquinone	RB-2	-	0,5	45	-	-	-
	PSB-1011 ou RB-4	0,4	0,08	0,5	>10	-	>10
	PSB-10211	-	0,086	-	N.D.	-	-
Analogues de la cyano guanidine	A-740003	>10	>10	-	>10	>10	0,02-0,7
	A-804598	>10	>10	-	>10	-	0,01
Différents composés organiques	BBG	>5	1,4	>10	3-100	0,5	0,015-0,25
	Paroxétine	-	-	-	2	-	-
	KN-62	-	-	-	-	-	10
	RO-85	>10	0,032-0,4	>10	>10	>10	>10
	A-317491	>10	>100	0,1	>100	-	>100
	RO 0437626	3	>100	>100	-	-	-
Modulateurs³							
Macrocyclé	Ivermectine	-	>30	>30	0,25	-	>30
pH	Protons	(-) pKa 6,3	(+) pKa 7,3	(-) pKa 6,0	(-) pKa 6,8	-	(-) pKa 6,1
Cations divalents	Calcium	Pas d'effet	(-) 5 mM	(-) 15 mM	-	(-) 10 mM	-
	Magnésium	-	-	-	-	-	(-) 500
	Zinc	(-)	(+) 7-30	-	(+) 5	(+) 10	-
	Cuivre	-	(+) 3	-	(-) 10	-	-
	Cadmium	(-) N.D.	(+) >100	-	(+) 20	-	-
Cations trivalents	Gadolinium	(-) 10	(-) 1	-	-	-	-
	Lanthane	-	(-) 10	-	-	-	-

Table 2. Pharmacologie des récepteurs P2X. P, signifie agoniste partiel, (+), modulateur positif, (-), modulateur négatif, N.D., testé mais non déterminé, -, non testé. Les données de ce tableau ne sont qu'indicatives car les CE₅₀ et CI₅₀ varient en fonction de l'espèce et du système d'expression. Les références utilisées sont : **1**, (Bo et al 2003, Buell et al 1996, Chen et al 1995, Donnelly-Roberts et al 2009a, Eickhorst et al 2002, Evans et al 1995, Garcia-Guzman et al 1997, He et al 2003, He et al 2002, Jarvis et al 2001, Jones et al 2000, Lewis et al 1995, Liu et al 2001, Lynch et al 1999, Roger et al 2008, Soto et al 1996, Surprenant et al 1996, Wildman et al 1999a, Wildman et al 2002, Wildman et al 1999b, Wolf et al 2011, Yan et al 2010, Zemkova et al 2004) ; **2**, (Baqi et al 2011, Bo et al 2003, Brake et al 1994, Braun et al 2001, Brotherton-Pleiss et al 2010, Buell et al 1996, Carter et al 2009, Donnelly-Roberts et al 2008, Donnelly-Roberts et al 2009a, Donnelly-Roberts et al 2009b, Evans et al 1995, Gever et al 2010, Hibell et al 2001, Honore et al 2006, Jacobson et al 1998, Jahangir et al 2009, Jaime-Figueroa et al 2005, Jarvis et al 2002, Jiang et al 2000a, Kassack et al 2004, Kim et al 2001, King et al 1999, Klapperstück et al 2000, Kotnis et al 2010, Lambrecht et al 2000, Lewis et al 1995, Lewis et al 1998, Liu et al 2001, Lynch et al 1999, Michel et al 2000, Nagata et al 2009, North & Surprenant 2000, Rettinger et al 2000, Soto et al 1996, Soto et al 1999, Surprenant et al 1996, Virginio et al 1998b, Wildman et al 2002, Wolf et al 2011) ; **3**, (Acuña-Castillo et al 2007, Acuña-Castillo et al 2000, Bo et al 2003, Brake et al 1994, Clarke et al 2000, Clyne et al 2002, Coddou et al 2007, Coddou et al 2005, Coddou et al 2003, Ding & Sachs 1999a, Evans et al 1996, Gerevich et al 2007, Khakh et al 1999a, Kotnis et al 2010, Liu et al 2009, Liu et al 2008, Lorca et al 2005, Nakazawa & Ohno 1997, Soto et al 1996, Stoop et al 1997, Surprenant et al 1996, Virginio et al 1997, Virginio et al 1998a, Wildman et al 1999b, Xiong et al 1999, Yan et al 2005).

Abréviation des molécules listées dans la table 2, nom usuel et ou IUPAC :

ATP, adénosine-5'-thiotriphosphate; **2-meSATP**, 2-méthylthio- adénosine-5'-thiotriphosphate; **α , β -meATP**, α , β -méthylène- adénosine-5'-thiotriphosphate; **β , γ -meATP**, β , γ -méthylène- adénosine-5'-thiotriphosphate; **ATP γ S**, adénosine-5'-O-(3-thiotriphosphate); **Ap₃A**, diadénosine-triphosphate; **Ap₄A**, diadénosine-tétraphosphate; **Ap₅A**, diadénosine-pentaphosphate; **Ap₆A**, diadénosine-hexaphosphate; **Bz-ATP**, 2',3'-O-(4-benzoylbenzoyl)-ATP; **CTP**, cytidine-5'-triphosphate; **TNP-ATP**, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl) adénosine 5'-triphosphate; **Ip4I**, diinosine tétraphosphate; **Ip5I**, Diinosine pentaphosphate; **NF023**, Acide 8,8'-[carbonylbis(imino-3,1-phénylèncarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalènetrisulfonique ; **NF279**, acide 8,8'-[carbonylbis(imino-4,1-phénylèncarbonylimino-4,1-phénylèncarbonylimino)]bis-1,3,5-naphthalènetrisulfonique; **NF449**, acide 4,4',4'',4'''-[carbonylbis(imino-5,1,3-benzènetriylbis(carbonylimino))]tétrakis-1,3-benzènedisulfonique; **NF770**, sel de 7,7'-(carbonylbis(imino-3,1-phénylène-carbonylimino-3,1-(4-méthylphénylène)carbonylimino))bis(1-méthoxy-naphthalène-3,6-disulfonate) tétrasodique ; **NF776**, sel de 6,6'-(carbonylbis(imino-3,1-(4-méthylphénylène)carbonylimino))bis(1-méthoxynaphthalène-3,5-disulfonate) tétrasodique ; **NF778**, sel de 6,6'-(carbonylbis(imino-3,1-phénylèncarbonylimino-3,1-(4-méthyl-phénylène)carbonylimino))bis(1-méthoxynaphthalène-3,5-disulfonate) tétrasodique ; **PPADS**, acide pyridoxal-5-phosphate 6-azophénylène-2',4'-disulfonique ; **PPNS**, acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2'-naphthylazo-6'-nitro-4',8'-disulfonique) ; **MRS2220**, acide 2-[[2-hydroxy-5-(hydroxyméthyl)-2-oxo-4H[1,3,2]dioxaphosphinino[4,5-c]pyridin-8-yl]diazényl]benzène-1,4-disulfonique; **MRS2159**, acide 4-[(4-formyl-5-hydroxy-6-méthyl-3-[(phosphonoxy)méthyl]-2-pyridinyl)azo]-benzoïque ; **MRS2257**, Pyridoxal-5'-phosphate-6-azophényl-3',5'-biméthylèncarboxylate; **RO-4 (AF-353)**, 5-(5-iodo-2-isopropyl-4-méthoxyphénoxy)pyrimidine-2,4-diamine; **RO-3**, 5-[(4,5-diméthoxy-2-propan-2-ylphényl)méthyl]pyrimidine-2,4-diamine ; **RO-51**, 2-[[4-amino-5-(5-iodo-4-méthoxy-2-propan-2-ylphénoxy)pyrimidin-2-yl]amino]propane-1,3-diol ; **RB-2**, reactive blue 2, acide 1-amino-4-[4-[[4-chloro-6-(3-sulfonatoanilino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-3-sulfonatoanilino]-9,10-dioxoanthracène-2-sulfonate; **RB-4 (PSB-1011)**, acide 1-amino-4-((3-((4,6-dichloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino)-4-sulfonatophényl)amino)-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracène-2-sulfonate; **PSB-10211**, 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)phénylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracène-2-sulfonate; **A-740003**, N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) méthyl) amino)-2,2-diméthylpropyl)-2-(3,4-diméthoxyphényl)acétamide ; **A-804598**, 2-cyano-1-[(1S)-1-phényléthyl]-3-quinolin-5-ylguanidine ; **A-804598**, 1-cyano-2-[(1S)-1-phényléthyl]-3-quinolin-5-ylguanidine ; **BBG**, coomassie brilliant blue G, [(4Z)-4-[[4-(4-éthoxyanilino)phényl]-4-éthyl-[(3-sulfophényl)méthyl]amino]-2-méthylphényl]méthylidène]-3-méthylcyclohexa-2,5-diène-1-ylidène)-éthyl-[(3-sulfophényl)méthyl]azanium ; **KN-62**, 1-[N,O-bis(5-isoquinolinesulfonyl)-N-méthyl-L-tyrosyl]-4-phénylpipérazine; **RO-85**, acide 1-méthyl-3-phényl-1H-thiéo[2,3-c]pyrazole-5-carboxylique ; **A-317491**, 5-[[[(3-phénoxyphényl)méthyl][(1S)-1,2,3,4-tétrahydro-1-naphthalényl]amino]carbonyl]-1,2,4-benzènetricarboxylate; **RO 0437626**, N-[(1R)-2-[(1S,2R,3S)-1-(cyclohexylméthyl)-3-cyclopropyl-2,3-dihydroxypropyl]amino]-2-oxo-1-(4thiazolylméthyl)éthyl]-1H-benzimidazole-2-carboxamide.

Les modulateurs.

Les métaux essentiels, tels le zinc et le cuivre, sous leur forme ionique libre (Zn^{2+} , Cu^{2+}), sont des modulateurs allostériques des récepteurs P2X. Ces deux métaux sont transportés par divers transporteurs dans les neurones et stockés avec les neurotransmetteurs dans des vésicules synaptiques. Ce mécanisme de concentration permet de libérer les métaux dans la fente synaptique avec une concentration de l'ordre de la centaine de micromolaire (Coddou et al 2011). Le zinc joue un rôle complexe au sein du cerveau en étant impliqué dans des voies de signalisation physiologiques et pathologiques (Sensi et al 2009). Le zinc est un métal dont les effets ont été largement étudiés sur P2X. Ses effets diffèrent selon le sous-type de P2X et l'espèce. Par exemple, le zinc

inhibe les récepteurs P2X2 humain (hP2X2) et P2X1 de rat (rP2X1) tandis qu'il potentialise fortement la réponse ATP chez le récepteur P2X2 de rat (rP2X2). Le site zinc de rP2X2 a été identifié et localisé au niveau de la bordure du site de fixation de l'ATP sur deux sous-unités adjacentes. Le zinc chélate les histidines H120 et H213 (notation rP2X2). En 2012, nous avons démontré que le zinc potentialise la réponse ATP sur rP2X2 en favorisant les modifications conformationnelles, à l'origine de l'ouverture du canal, induite par l'ATP.

Revenons aux dérivés organiques. L'ivermectine fait partie de la classe des avermectines, des lactones macrocycliques à activité antihelminthique. Cette molécule prescrite comme antiparasitaire dans les cas d'infestation par des nématodes est un potentiateur allostérique de P2X. L'ivermectine interagit au niveau des hélices TM1 et TM2 du récepteur et stabilise l'état ouvert (Khakh et al 1999b).

Ce chapitre montre les limites de la pharmacologie conventionnelle comme outil d'étude des récepteurs P2X. En effet, cette stratégie manque considérablement de molécules sélectives d'un sous-type P2X. De plus, la libération de molécules pharmacologiques dans des tissus natifs est lente et imprécise, car la disponibilité de la molécule est réduite par sa diffusion et son interaction non sélective avec d'autres protéines, comme c'est le cas des suramines avec les protéoglycanes des tissus conjonctifs (McNally et al 2000). La molécule peut aussi être métabolisée, avec comme exemple le TNP-ATP (Lewis et al 1998). Pour finir, les molécules pharmacologiques sélectives ne pourront pas différencier un sous-type de récepteur ou de pompe ionique exprimé dans des types cellulaires différents.

2.4. Structure des récepteurs P2X

Bref historique.

Les premières informations sur la structure tridimensionnelle des récepteurs P2X furent apportées par des expériences de microscopie à force atomique (MFA) (Fig. 8a, b) et de microscopie électronique (ME) (Fig. 8c) (Barrera et al 2005, Young et al 2008). En février 2009, la structure du récepteur P2X fut reconstruite par microscopie cryoélectronique, avec une résolution de 15 Å et révéla l'architecture trimérique de P2X, leur domaine extracellulaire globulaire, deux voies de passage possible des cations au travers du récepteur et l'interaction entre les extrémités intracellulaires N- et C-terminales (Fig. 8d, e, f) (Mio et al 2009). Quelques mois plus tard, en juillet 2009, l'équipe d'Eric Gouaux résolut la structure cristallographique des récepteurs P2X, dans un état fermé et confirma la topologie du récepteur (Kawate et al 2009). Cette structure révéla la proximité spatiale de résidus, identifiés par mutagenèse dirigée (Jiang et al 2000b), impliqués dans l'affinité apparente de l'ATP pour le récepteur. En l'absence d'une structure en présence du ligand, le site de fixation de l'ATP restait spéculatif. En 2011, nous avons localisé le site fixation de l'ATP par marquage d'affinité avec un dérivé ATP thiol-réactif (Jiang et al 2011). Puis en mars 2012, nous avons élucidé le mécanisme d'activation des récepteurs P2X, c.-à-d. les mouvements opérés dans la protéine qui induisent l'ouverture du canal suite à la fixation de l'ATP (Jiang et al 2012a). (Ces deux derniers points seront développés dans les chapitres 3 et 4). Finalement, en mai 2012, la résolution des structures cristallographiques, du récepteur en présence d'ATP et en absence d'ATP (Hattori & Gouaux 2012), permit de confirmer nos résultats et de corriger des erreurs présentes dans la structure de 2009 (Fig. 9).

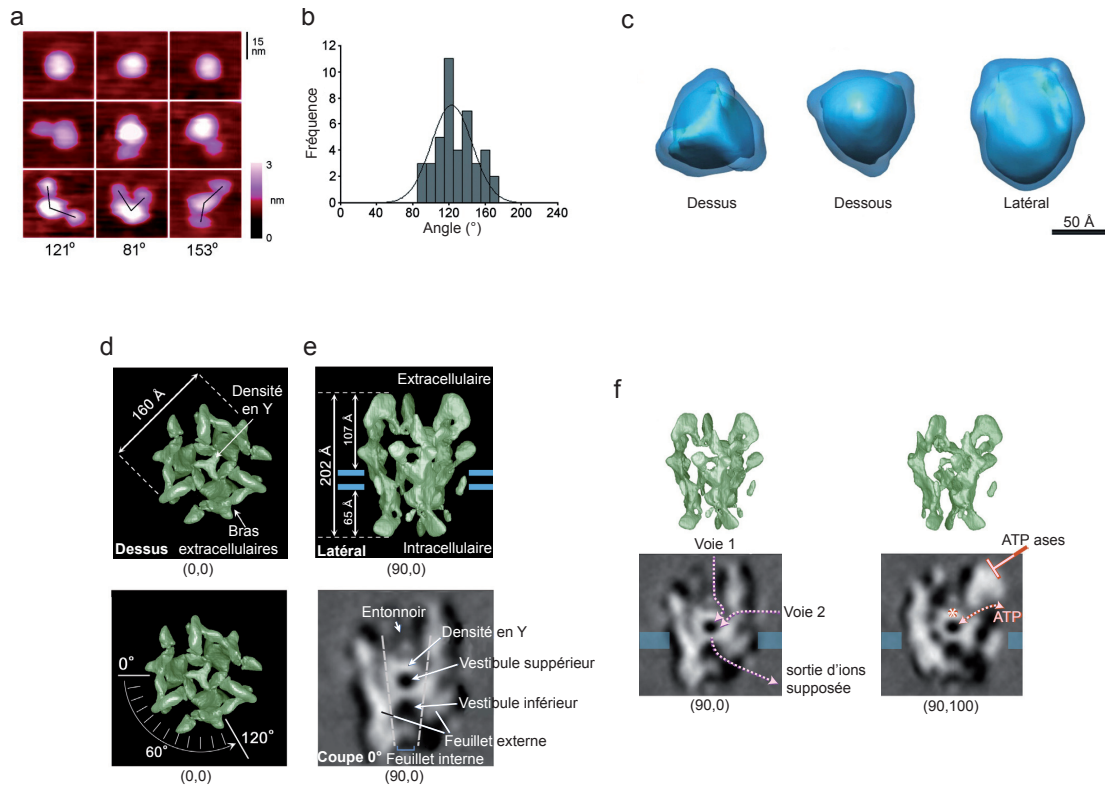


Figure 8. Architecture trimérique des récepteurs P2X vue par microscopie force atomique (MFA) et microscopie électronique (ME). (a) Série d'images grossies de P2X2 obtenues par MFA qui montrent des récepteurs non marqués (images du haut) ou marqués une (images intermédiaires) ou deux fois par des anticorps (images du bas). (d) Distribution de fréquence des angles mesurés entre deux anticorps (42 mesures). La distribution est une gaussienne avec une moyenne de $123 \pm 3^\circ$ (Barrera et al 2005). Structure du récepteur P2X4 humain, obtenue par ME, à une résolution de 21 Å (Young et al 2008). (d, e, f) Reconstruction de la structure des récepteurs P2X2 avec un résolution de 15 Å à partir de plus de 90 000 images obtenues par microscopie cryoélectronique. (d) Récepteur vu du dessus montrant un axe de symétrie d'ordre 3 passant par le centre du récepteur. (e) Vues latérales du récepteur avec description des différentes parties. (f) A gauche, voies de passage possibles des ions au travers du récepteur. A droite, localisation d'un site qui protégerait l'ATP des ATPases (Mio et al 2009).

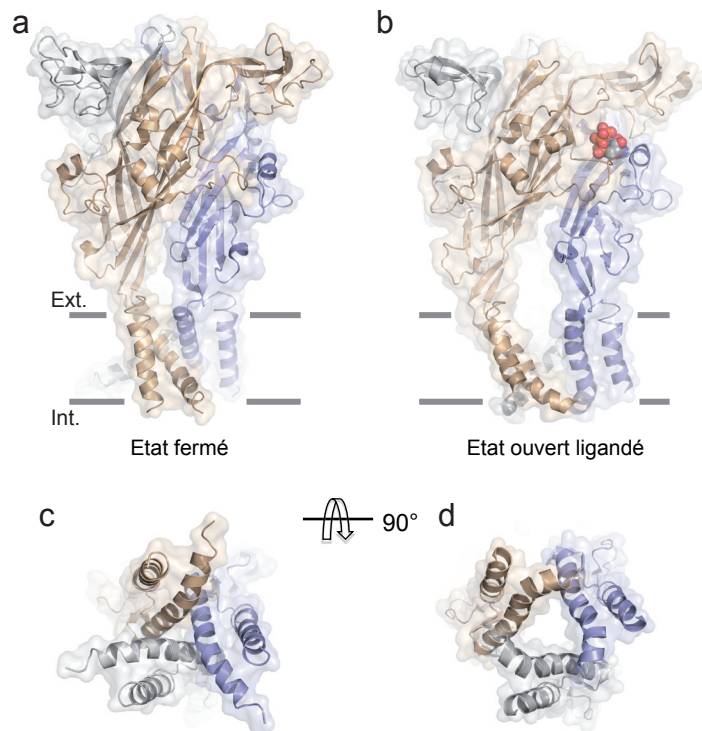


Figure 9. Architecture du récepteur P2X4 du poisson zèbre. (a, b) Vue latérale de la structure trimérique du récepteur zfP2X4 (a) Canal fermé (b) canal ouvert. Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente, l'ATP est représenté par des sphères rouges. (c, d) Vue du milieu extracellulaire (c) Canal fermé, (d) canal ouvert.

Structure cristallographique. Vue globale.

Les récepteurs P2X ont une forme globale qui s'apparente à un calice. Leur domaine extracellulaire proéminent s'élève à ~ 70 Å au dessus du plan de la membrane. Le domaine transmembranaire possède une forme de sablier et s'étend au travers de la membrane sur ~ 28 Å. Ce dernier domaine est constitué de l'association des hélices transmembranaires TM1 et TM2. Les hélices TM2 de chaque sous-unité sont inclinées de 45° par rapport à la normale du plan de la membrane et définissent le pore du canal. Chaque sous-unité possède une conformation similaire et adopte une forme de dauphin surgissant d'une mer lipidique. TM1 et TM2 forment la queue du mammifère, le domaine extracellulaire constitue le reste du dauphin avec les parties basse et haute du corps, les nageoires gauche et droite, la nageoire dorsale, et pour finir, la tête du dauphin (Fig. 10). Cette représentation imagée permet de faciliter l'exploration de la structure.

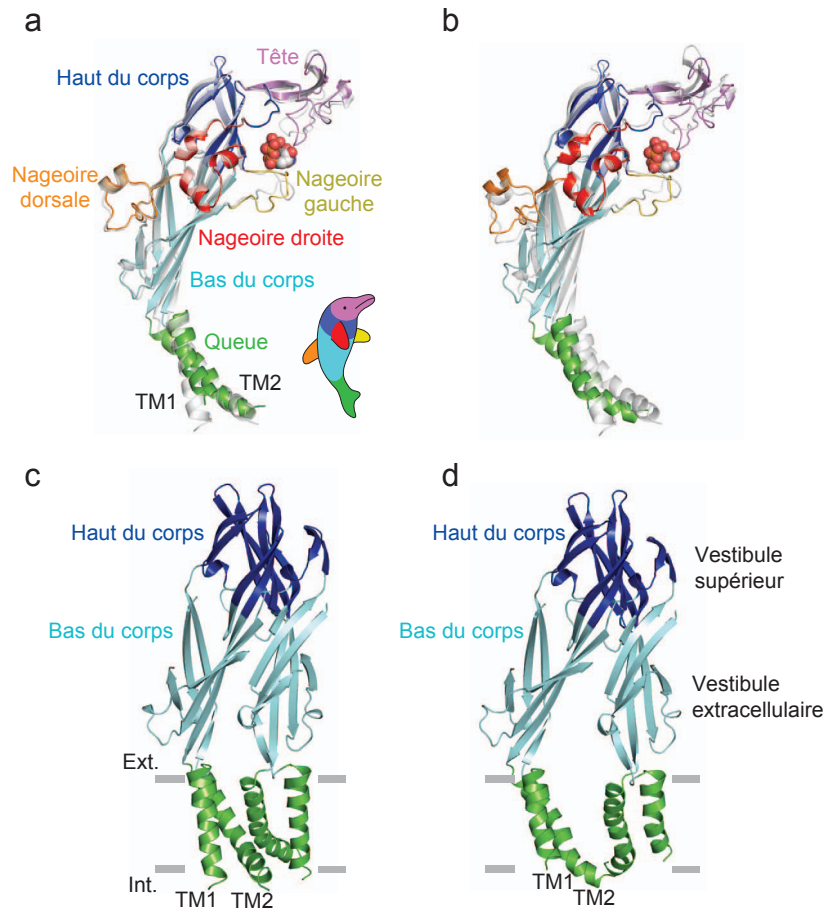


Figure 10. Analyse des modifications conformationnelles du récepteur zfp2X4. Chaque élément d'une sous-unité est représenté d'une couleur différentes (a, b) Superposition des structures cristallographiques sous l'état ouvert (couleurs) et fermé (gris) en fonction des positions des C α (a) d'une sous-unité (b) du trimer. (c, d) Domaine transmembranaire et extracellulaire (c) sous l'état fermé et (d) sous l'état ouvert (représentation de deux sous-unités). (Hattori & Gouaux 2012)

Domaine transmembranaire.

Site de reconnaissance de l'ATP.

Le site de fixation de l'ATP (Fig. 11) est localisé dans le domaine extracellulaire à l'interface entre deux sous-unités. Ce site, riche en résidus basiques, est une large cavité bordée dans sa partie supérieure par la tête et la partie haute du corps d'une même sous-unité et dans sa partie inférieure par la nageoire dorsale et la partie basse du corps d'une sous-unité adjacente. Au sein de son site de fixation, l'ATP adopte une forme de « U », avec les phosphate β et γ pliés vers le cycle du ribose. De manière remarquable, un atome d'oxygène du phosphate γ est impliqué dans une liaison hydrogène avec l'hydroxyle 2' du ribose. L'hydroxyle 3', quant à lui, explore le solvant et

pointe vers l'extérieur du site. L'adénine adopte une conformation « anti » par rapport au ribose. Les résidus responsables de la fixation de l'ATP sont, la Lys 70, la Lys 72, la Thr 189, la Leu 191, la Lys 193 et la Leu 217 d'une sous-unité et l'Asp 296, l'Arg 298 et la Lys 316 de la sous-unité adjacente (notation pour zfP2X4). Les lysines et l'asparagine 296 sont impliquées dans l'interaction avec les phosphates. La lysine 70 (69 pour rP2X2) joue un rôle central car son ammonium se trouve au centre du « U » formé par les phosphates et interagit avec un atome d'oxygène de chacun des phosphates (α , β et γ). La lysine 72 interagit de manière originale avec l'ATP, les carbones de sa chaîne latérale interagissent de manière hydrophobe avec l'adénine, tandis que son ammonium interagit avec le phosphate γ . La lysine 193 interagit avec le phosphate α par l'intermédiaire de l'hydroxyle d'un glycérol. Cet hydroxyle pourrait être substitué par celui d'une molécule d'eau dans des conditions physiologiques. L'asparagine 296 et la lysine 316 interagissent avec le phosphate β , tandis que l'arginine 298 et la lysine 316 interagissent avec le phosphate γ .

La reconnaissance de l'adénine est basée sur trois liaisons hydrogène. Les deux premières entre l'amine aromatique en position 6 du cycle de la base et les atomes d'oxygène des carbonyles de la chaîne principale des résidus Lys 70 et Thr 189. La dernière liaison hydrogène se fait entre l'hydroxyle de la chaîne latérale de Thr 189 et le N1 de l'adénine.

La nageoire dorsale n'interagit avec l'ATP que par l'intermédiaire de la leucine 217 qui participe à l'environnement hydrophobe du cycle du ribose.

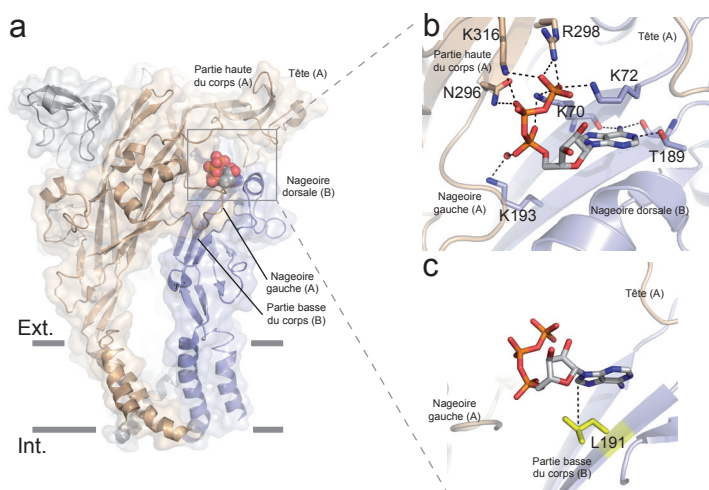


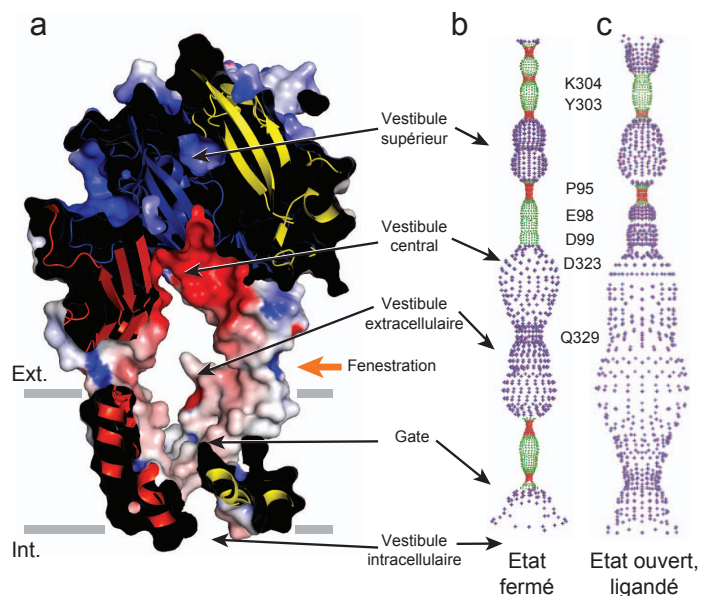
Figure 11. Le site de fixation de l'ATP. Agrandissement du site de liaison de l'ATP. (a) La sphère rouge représente l'atome d'oxygène d'une molécule de glycérol. Les lignes discontinues noires indiquent les liaisons hydrogènes inférieures à 3,3 Å. (b) Vue présentant la proximité spatiale entre l'atome C8 du cycle de l'adénine et le C γ de L191 (homologue du L186 de rP2X2).

Voie d'accès des cations extracellulaires au canal (Fig. 12).

Dans un plan proche de la membrane, le récepteur possède trois ouvertures appelées fenestrations. Ces fenestrations permettent la communication entre le vestibule extracellulaire et le milieu extracellulaire et pourraient constituer la voie de passage des ions extracellulaires vers le canal. La structure dans un état fermé sans ATP, laissait penser que deux voies d'accès des cations au canal étaient possibles. L'une le long de l'axe de symétrie d'ordre trois du récepteur et l'autre par les fenestrations. La structure dans l'état ouvert montre que la voie centrale est trop étroite pour laisser passer les ions, tandis que les fenestrations s'élargissent considérablement. De plus, le vestibule extracellulaire est riche en résidus acides qui permettent de concentrer les cations à proximité du canal. Les fenestrations constituent donc la voie par laquelle les ions entrent et sortent du récepteur. Ceci est en accord avec des expériences d'accessibilité de cystéines et de pontage de paires de cystéines (kawate 2011 et samways 2011).

Figure 12. Le pore transmembranaire.

(a) Représentation des potentiels électrostatiques de surface sous l'état ouvert. La surface est cartographiée de $-10kT$ (rouge) à $+10kT$ (bleu) (constante diélectrique : 80). (b, c) Représentation de l'espace interne du récepteur le long de son axe central (b) sous l'état fermé et (c) sous l'état ouvert, chaque couleur représente le rayon moyen depuis l'axe central du récepteur (rouge : $< 1,15 \text{ \AA}$, vert : $1,15-2,3 \text{ \AA}$ et violet : $> 2,3 \text{ \AA}$). (Hattori & Gouaux 2012)



Domaine transmembranaire et canal ionique (Fig. 13).

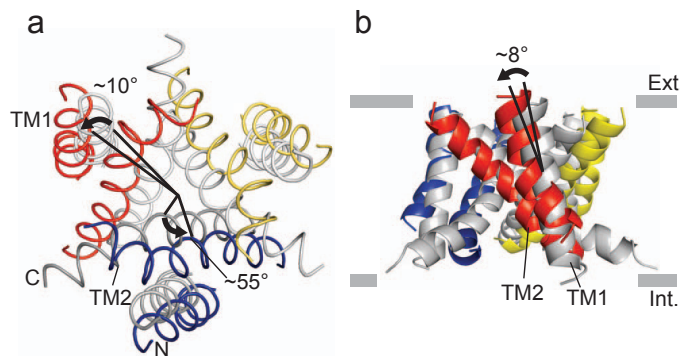


Figure 13. Transitions structurales du domaine transmembranaire. (a, b) Domaine transmembranaire sous l'état ouvert (couleurs) et sous l'état fermé (gris), (a) Vue du milieu intracellulaire (b) Vue parallèle à la membrane. (Hattori & Gouaux 2012)

Le pore est délimité par les hélices TM2 de chaque sous-unité. La structure fermée montre une zone de constriction, à environ mi-hauteur de la bicouche lipidique, qui constitue la porte du canal. Cette porte est délimitée dans sa partie extracellulaire par les résidus Leu 340 et Asp 341 (Ile 342 et Asp 333 pour rP2X₂) et dans sa partie intracellulaire par Ala 347 et Leu 346 (Leu 338 et Thr 339 pour rP2X₂). Le centre de la porte est occupé par le résidu Ala 334 (Thr 336 pour rP2X₂) qui définit la zone d'interaction la plus étroite entre les hélices TM2 (Kawate et al 2009). Cette dernière observation est en accord avec les résultats obtenus dans des expériences d'accessibilité de cystéines par des métaux et des agents MTS (Li et al 2008, Rassendren et al 1997). Le résidu Thr 339 (rP2X₂) est remarquable car il est impliqué dans l'ouverture constitutive du récepteur (Cao et al 2007). Lors de l'ouverture du canal les résidus Ala 344 s'éloignent considérablement les uns des autres (12,3 Å entre les méthyles de la chaîne latérale). Le diamètre le plus petit de la voie de passage des ions se situe au niveau des résidus Ala 347 et Leu 351 (~7 Å). L'ouverture du canal ne résulte pas du redressement des hélices, car les variations de leurs angles d'inclinaison par rapport à un axe parallèle à la membrane sont modestes, ~8° et ~2° pour TM1 et TM2 respectivement. L'ouverture du canal s'opère par les rotations antihoraires des hélices qui sont conséquentes, ~10° (TM1) et ~55° (TM2) par rapport à un axe perpendiculaire à la membrane. Ce mouvement d'ouverture, comparable à celui d'un diaphragme à iris, modifie les interactions entre les hélices qui se stabilisent dans un état ouvert (Hattori & Gouaux 2012).

Mécanisme d'activation des récepteurs P2X.

La fixation de l'ATP provoque la fermeture de son site de liaison en rapprochant la partie haute du corps d'une sous-unité et la partie basse de la sous-unité adjacente. Ces interactions entre l'ATP et le récepteur ont pour conséquence de rapprocher la tête d'une sous-unité et la nageoire dorsale de la sous-unité adjacente. Ces modifications conformationnelles provoquent l'éloignement de la nageoire gauche dans un mouvement descendant. Au sein d'une même sous-unité, les mouvements associés de remontée de la nageoire dorsale et de descente de la nageoire gauche induisent une flexion montante de la partie basse du corps. Ensuite, cette flexion de la partie basse du corps écarte substantiellement les fenestrations (~ 10 Å) et provoque l'ouverture du canal dans un mécanisme ressemblant à une ouverture en diaphragme à iris. (Fig. 14).

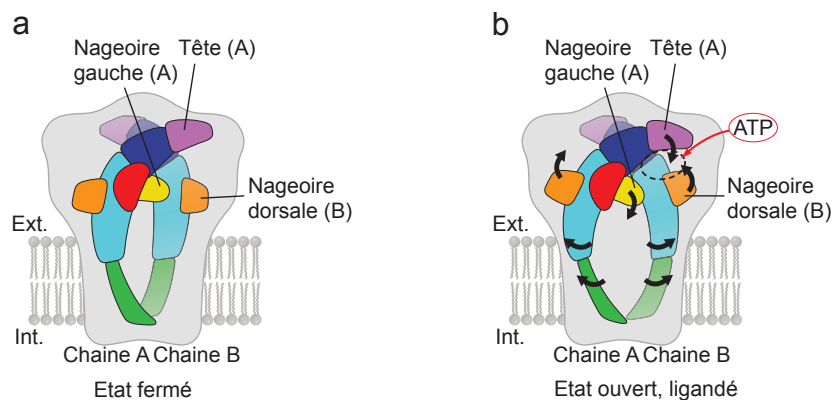


Figure 14. Modèle du mécanisme d'activation, du récepteur, par l'ATP. Les flèches noires indiquent les mouvements du passage de (a) l'état fermé à (b) l'état ouvert ligandé. (Hattori & Gouaux 2012)

3. Intégration de la lumière pour l'étude des récepteurs P2X

Ce chapitre détaille l'utilisation de la lumière, un stimulus « non invasif » original de contrôle sélectif et spécifique de pompe ioniques, de récepteurs canaux et métabotropiques, comme alternative à la pharmacologie conventionnelle.

Généralités et nomenclature.

L'utilisation de la lumière en neurobiologie se retrouve dans deux types d'approches, l'optopharmacologie et l'optogénétique. Ces approches sont elles même divisées en deux parties. L'optopharmacologie englobe les approches des précurseurs photolabiles de ligands (ligands cagés), photolibérables de manière irréversible, et celle des « photoswitches » chimiques ou ligands photochromiques dont l'activité biologique est modifiée réversiblement en fonction de la longueur d'onde d'irradiation. L'optogénétique comprend l'optogénétique microbienne, basée sur l'expression d'opsines microbiennes, et l'optogénétique pharmacologique qui permet le photocontrôle des pompes ioniques, des récepteurs canaux et métabotropiques. (Fig. 15)

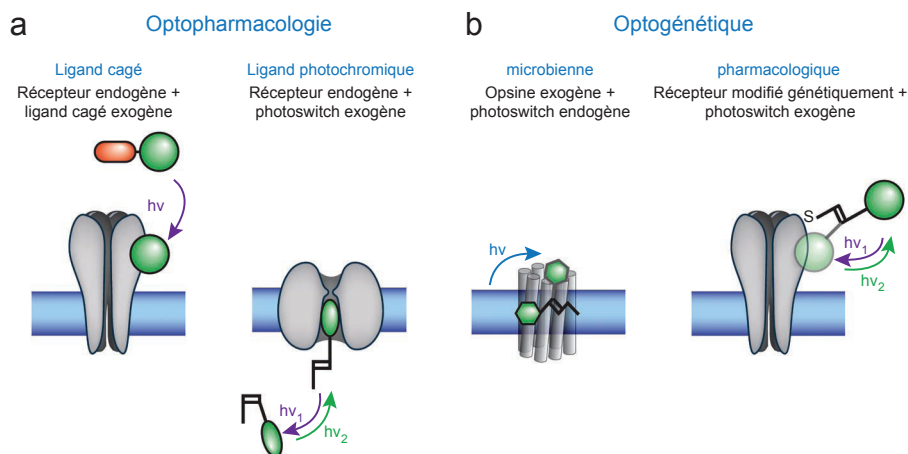


Figure 15. Outils pour le photocontrôle des fonctions neurales. (a) L'optopharmacologie. (b) L'optogénétique (Kramer et al 2013).

Les ligands cagés possèdent un groupement protecteur photolabile, appelé cage (Fig. 15a). Cette cage permet de masquer l'activité biologique du ligand, le rendant théoriquement inerte. Sous irradiation lumineuse, à une longueur d'onde appropriée, la liaison entre le ligand et la cage est rompue dans une

réaction de photolyse. Le ligand ainsi libéré pourra activer sa cible. Le but de la technologie des ligands cagés est de mimer la libération d'un neurotransmetteur dans une synapse. C'est chose faite avec l'utilisation d'un analogue du glutamate sensibles aux bi-photons (Matsuzaki et al 2001). La technologie de la microscopie bi-photonique associée à l'utilisation de cages possédant une cinétique de photolyse efficace permet la libération du neurotransmetteur dans un espace tridimensionnel restreint au point focal (ordre du micromètre) et dans un temps de l'ordre de la centaine de microsecondes. Les neurotransmetteurs cagés les plus utilisés sont les analogues du glutamate (Callaway & Katz 1993, Canepari et al 2001, Carter & Sabatini 2004, Matsuzaki et al 2001, Shepherd et al 2003). Récemment, au laboratoire, l'équipe d'Alexandre Specht a synthétisé un GABA cagé sensible aux bi-photons (Donato et al 2012). Les analogues cagés du GABA avant photolyse sont des antagonistes de leur cible (Canepari et al 2001, Donato et al 2012), montrant que les analogues de neurotransmetteurs cagés ne sont pas forcément biologiquement inertes. Un dérivés cagé de l'ATP, le P^3 -1-(2-nitro) phényléthyladénosine-5'-triphosphate (NPE-ATP), a été décrit en 1978 (Kaplan et al 1978). Ce composé pourrait être modifié pour une utilisation en bi-photonique. Cependant, l'ATP libéré, non sélectif et hydrolysé par les ectonucléotidases, ne permet pas d'activer sélectivement un sous-type P2X. De plus, pour mimer la libération massive de neurotransmetteurs dans la fente synaptique de fortes concentrations en ligands cagés, de l'ordre du millimolaire, sont nécessaires. Ces ligands seraient inefficacement éliminés par les mécanismes de recapture des neurotransmetteurs et pourraient perdurer anormalement dans le milieu extracellulaire, pouvant compliquer l'interprétation des résultats de photolibération (Kramer et al 2013).

Nous nous focaliserons sur les ligands photochromiques possédant un azobenzène intégré dans leur structure (Fig. 15a). Ces dérivés azobenzène peuvent se convertir réversiblement en un isomère *trans* long et un isomère *cis* court. Une irradiation dans le proche UV provoque l'isomérisation *cis* de l'azobenzène, ensuite le retour à l'isomère *trans* se fait lentement par relaxation thermique ou par une irradiation dans le visible. Ce changement de

conformation, contrôlable par la lumière, va permettre de moduler l'affinité du ligand pour son site de fixation. En d'autres termes, l'isomère *cis* provoque un encombrement stérique qui modifie l'interaction du ligand avec sa cible. Le premier ligand photochromique décrit est appelé Bis-Q (Bartels et al 1971). Il fut utilisé pour photoréguler l'activité des récepteurs de l'acétylcholine de membranes électrogéniques. Cette stratégie largement appliquée aux récepteurs canaux et canaux potassiques (Mourot et al 2012, Mourot et al 2011, Stein et al 2013, Stein et al 2012), est aussi utilisée pour photoréguler l'activité d'enzymes (Abell et al 2007, Harvey & Abell 2000, Pearson & Abell 2006, Pearson et al 2008). Récemment un dérivé photochromique de l'ATP capable de photoréguler la dynamique du système kinésine-microtubule *in vitro* a été décrit (Kamei et al 2012). Mais comme pour les ligands cagés, un ATP-photochromique ne permet pas de photoréguler sélectivement les récepteurs P2X.

Ces deux stratégies possèdent les mêmes inconvénients que la pharmacologie conventionnelle (cf. conclusion du chapitre 2.3.). L'optogénétique constitue une approche complètement différente qui utilise la lumière comme moyen de contrôle direct de l'activité de neurones en s'affranchissant d'un neurotransmetteur diffusible.

3.1. Optogénétique *versus* pharmacologie optogénétique

L'optogénétique est définie comme la combinaison de méthodes génétiques et optiques dans le but de provoquer un gain ou une perte de fonction d'événements définis, dans des cellules spécifiques de tissus vivants (Deisseroth 2011). Dans les années 2000, deux stratégies optogénétiques font la preuve du concept. La lumière permet le contrôle direct de l'activité de neurones. La première stratégie, nommée très récemment pharmacologie optogénétique (Fig. 15b) (Kramer et al 2013), utilise l'expression, dans des neurones, d'un canal potassique modifié. Ce canal est rendu sensible à la lumière suite à la réaction covalente d'une molécule synthétique photoisomérisable contenant un ammonium quaternaire, bloquant du canal

(Banghart et al 2004). La deuxième stratégie, connue sous le terme d'optogénétique, que nous appellerons optogénétique microbienne (Fig. 15b), est basée sur l'expression d'une opsine microbienne dans les neurones pour en contrôler l'activité (Boyden et al 2005). Ces deux stratégies, très différentes, se font concurrence dans le monde de l'optogénétique. Dans la suite, nous verrons comment chacune de ces stratégies permettent le contrôle des neurones, avec leurs avantages et inconvénients.

3.1.1. L'optogénétique : Les Rhodopsines

Généralités.

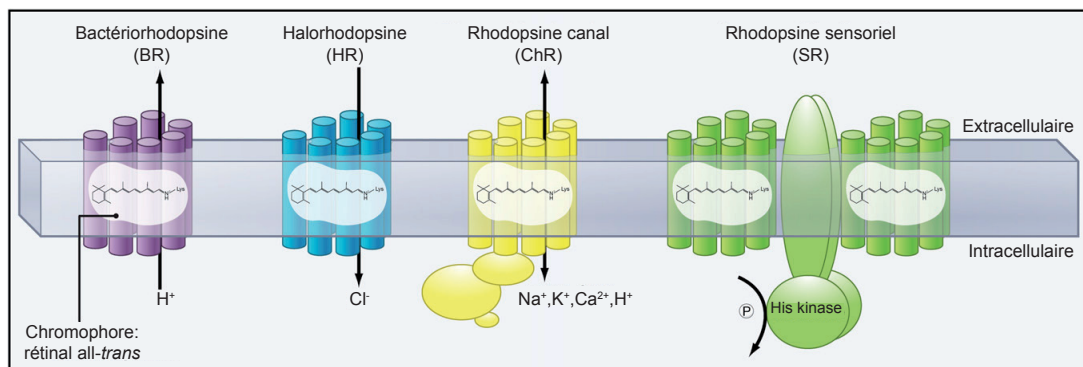
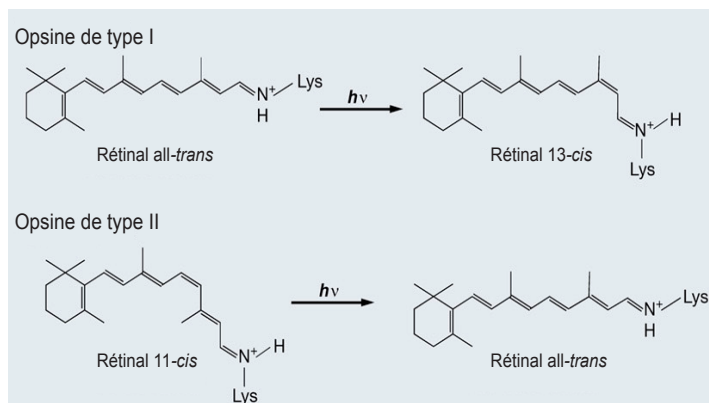


Figure 16. Représentation schématique des différentes opsines de type I. (Zhang et al 2011)

La rhodopsine est un complexe entre une opsine et le rétinol. Les opsines sont des protéines à sept hélices transmembranaires se répartissant en deux superfamilles, celle des opsines microbiennes dites de type I et celle des opsines animales dites de type II retrouvées dans les eucaryotes supérieurs. Les opsines de type I se distinguent des opsines de type II par leur capacité à laisser passer les ions au travers de la membrane (Fig. 16). Cette particularité fait des opsines microbiennes un outil de choix pour le contrôle de l'activité neurale. Les opsines de type II sont quant-à-elles des récepteurs couplés aux protéines G principalement impliqués dans la vision.

Figure 17. Isomérisation du rétinol induite par la lumière. Le rétinol all-*trans* est retrouvé dans l'état de repos sans lumière dans les rhodopsines microbiennes (opsine de type I) et dans des états actifs induits par la lumière chez les rhodopsines de type II des eucaryotes supérieurs (opsine de type II). En haut, l'absorption d'un photon provoque le passage du rétinol all-*trans* à l'isomère 13-*cis*. En bas, un photon induit l'isomérisation du rétinol 11-*cis* en all-*trans*. (Zhang et al 2011)



Le rétinol (Fig. 17), aussi connu sous le nom de vitamine A, est le cofacteur nécessaire pour rendre l'opsine sensible à la lumière. Le rétinol réalise une base de Schiff avec une lysine conservée au niveau de la septième hélice transmembranaire (TM7). L'environnement ionique de cette base de Schiff, chargée positivement, détermine les caractéristiques spectrales de chaque rhodopsine. Cet environnement est conditionné par les acides aminés qui délimitent la poche de fixation du rétinol. Il serait donc théoriquement possible de régler les longueurs d'ondes d'activations de la rhodopsine par génie moléculaire. En réalité les modifications fondamentales du spectre d'action et de la perméabilité ionique, par l'utilisation du génie moléculaire seul, ont échoué (Zhang et al 2011), témoignant de la complexité de ces protéines. Cependant, les analyses génomiques en association avec le génie moléculaire ont permis d'identifier et de mettre en place une large gamme de rhodopsines, mutées ou chimériques, avec des propriétés spectrales et des perméabilités ioniques variées (Fig. 18).

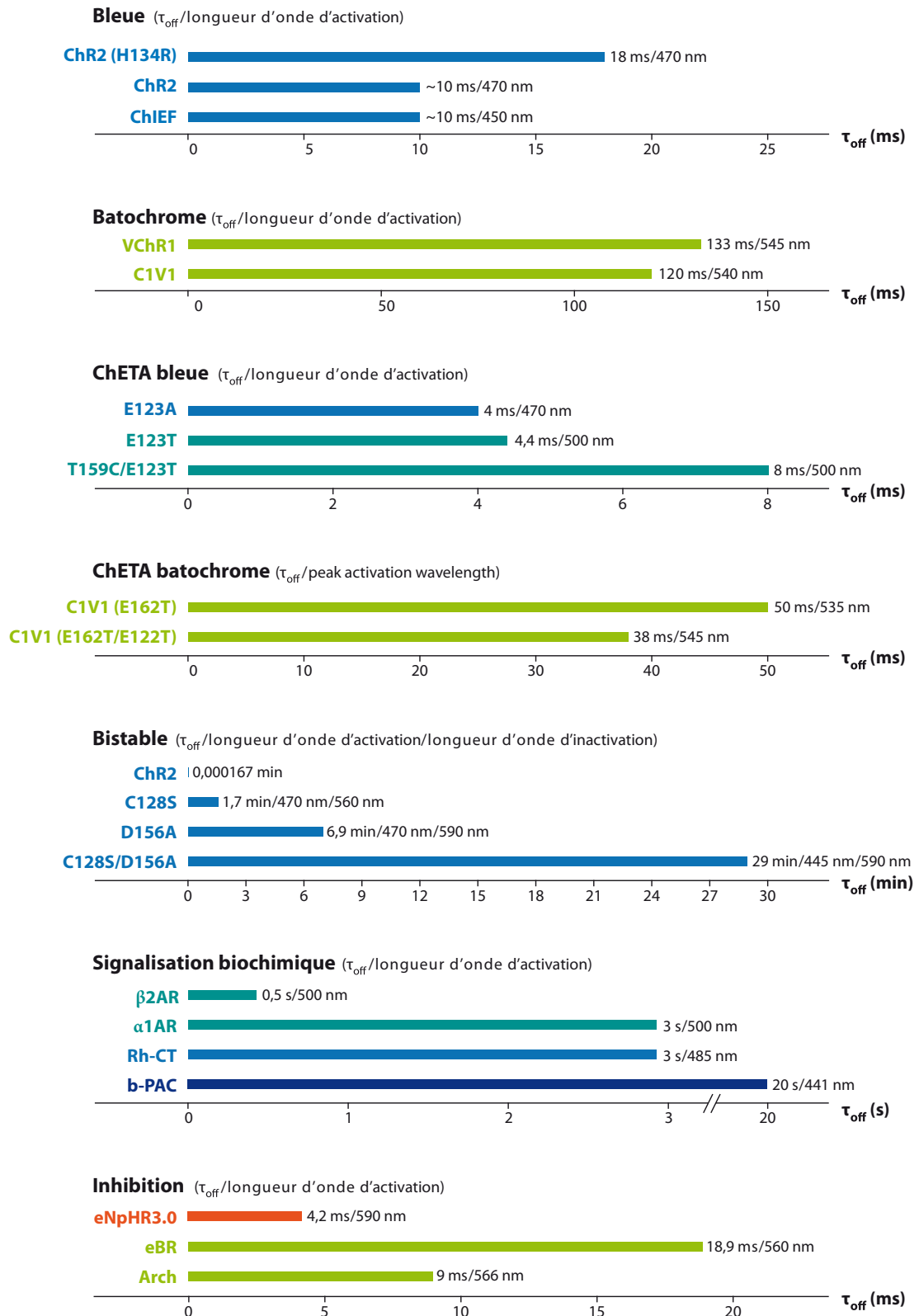


Figure 18. Opsines microbiennes disponibles comme outils optogénétiques. Les constantes de désactivation (τ_{off}), ainsi que les longueurs d'ondes d'activation et d'inactivation approximatives sont données pour les différentes opsines. Bleu correspond aux opsines activées par la lumière bleue. La ChR2 est la rhodopsine canal 2. Elle possède un codon humain pour optimiser son expression. La ChIEF est une chimère entre les rhodopsines canal 1 et 2 (ChR1 et ChR2) qui contient la mutation I170V pour restaurer le τ_{off} . La ChIEF est faiblement désensibilisante. Les opsines batochromes sont des opsines dont la longueur d'onde d'activation est déplacée vers le rouge. La VChR1 est la rhodopsine canal 1 de *Volvox carteri*. La C1V1 est une chimère entre VChR1 et ChR1. Elle possède les propriétés spectrales de

VChR1 associées avec l'expression de ChR1. Les ChETA sont des ChR2 avec la mutation d'un résidu glutamate (E) muté en thréonine (T) ou en alanine (A). Ces mutations permettent de diminuer la désensibilisation et le τ_{off} . Les ChETA batochromes sont des C1V1 possédant les mutation des ChETA, ce qui permet de réduire considérablement leur τ_{off} . Les opsines bistable sont des ChR2 portant des mutations permettant d'augmenter considérablement le τ_{off} . La ChR2 est indiquée pour l'échelle seulement. Bistable que les états cis et trans sont stables dans le temps. Les rhodopsines bistables sont activées par la lumière bleue (rétinal *cis*) et désactivées par la lumière verte ou même rouge (rétinal *trans*), ainsi chaque état est contrôlé. Les opsines de signalisation biochimiques sont des opsine couplées aux protéines G possédant l'activité de récepteurs couplés aux protéines G. β 2AR et α 1AR pour les récepteurs adrénergiques de type β et α . Rh-CT pour les récepteur de la sérotonine de type 1A, 5-HT1A. b-PAC pour « bacterial Photoactivated Adenylyl Cyclase ». eNpHR3.0 est une halorhodopsine 3.0 de *Natronomonas pharaonis* perméable au chlore, dont la longueur d'onde d'activation est déplacée dans le rouge et dont l'expression est optimisée (e, « enhanced »). eBR est une BactérioRhodopsine. Arch est une rhodopsine d'archée. L'eBR et l'Arch sont des pompes à protons capables d'hyperpolariser les neurones. (Informations et schéma tirés de (Fenno et al 2011)).

Seul le mécanisme de pompe à protons de la bactériorhodopsine (BR) est complètement identifié. En revanche, la voie de passage des cations au travers de la rhodopsine canal 2 (ChR2) reste encore spéculative. Un modèle par homologie de la ChR2 basé sur la structure de la BR montre un alignement de résidus acides et basiques qui pourraient constituer la voie de passage des cations au travers de la protéine (Fig. 19).

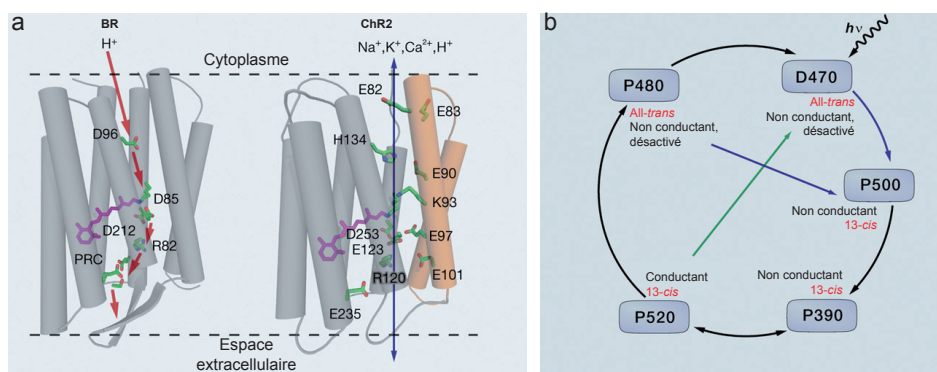


Figure 19. Homologie structurale et fonctionnelle entre BR et ChR2. (a) Le mécanisme de transfert des protons au travers la BR est clairement établi et fait intervenir une chaîne de résidus acides et basiques (à gauche). Modèle par homologie de la ChR2 basé sur la structure de la BR révélant un axe riche en résidus acides pouvant constituer la voie de passage des cations. (b) Modèle simplifié du photocycle des ChRs. Chaque état est nommé par une lettre majuscule suivit de la longueur d'onde du maximum d'absorbance caractéristique de cet état. L'état D470 de repos, dans noir, passe à un état conducteur P520 en passant par deux états intermédiaires P500 et P390 suite l'isomérisation du rétinale induite par la lumière. Le retour à l'état de départ D470 se fait thermiquement en passant par l'état P480 ou bien photochimiquement par des intermédiaires de courte vie (flèche verte). L'état P480 peut aussi être activé pour rejoindre l'état P500. (Zhang et al 2011).

Nous allons aborder la voie de translocation des protons vers le milieu extracellulaire au travers de la BR de manière succincte. L'absorption d'un photon provoque un changement de conformation du rétinale qui passe de

l'isomère *all-trans* à l'isomère *13-cis*. La base de Schiff va alors changer d'orientation et expulser son proton dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire d'une chaîne de résidus acides. Dans un second temps, la base de Schiff est reprotonnée par un proton extracellulaire amené par une chaîne de molécules d'eau et d'un résidu acide. Ce transfert de protons, en réalité complexe, se met en place dans un photocycle composé de différents états intermédiaires caractérisables par leur signature spectrale. (Pour plus de détails cf. (Kühlbrandt 2000, Zhang et al 2011)).

Contrôle de l'activité neurale.

Trente ans après la découverte de la première bactériorhodopsine (Oesterhelt & Stoerkenius 1971), en 2005, l'expression de la rhodopsine canal 2 (ChR2) a permis de contrôler l'activité de neurones d'hippocampe de rat (Boyden et al 2005). Les auteurs utilisèrent un lentivirus pour exprimer la ChR2 dans des neurones d'hippocampe de rat (Fig. 20).

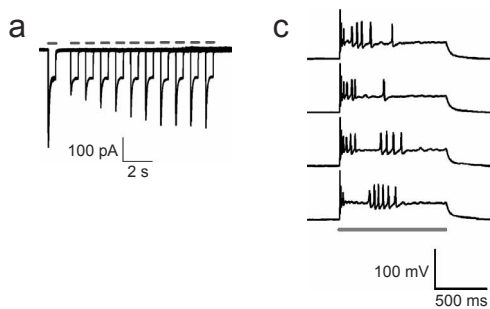


Figure 20. Contrôle de l'activité neurale par l'intermédiaire de la ChR2. (a) Courant entrants provoqués par des pulses de lumière de 500 ms appliqués toutes les 1 à 10s (tirets gris) chez des neurones d'hippocampe de rat exprimant la ChR2. (c) Traces électrophysiologiques de potentiel de membrane en mode courant imposé montrant des pics de dépolarisation pendant une irradiation lumineuse (barre grise) (Boyden et al 2005).

Le point fort de la ChR est que le rétinol lui conférant sa photosensibilité est naturellement contenu dans les tissus des vertébrés. Les organismes vivants possèdent les systèmes biologiques pour capter le β -carotène, précurseur de la vitamine A, et le transformer en rétinol. En d'autre terme il suffit d'exprimer la ChR dans le type cellulaire désiré pour qu'elle soit alimentée en rétinol. Le « pool » de ChR sera renouvelé en permanence sans perdre en photosensibilité.

Ce système puissant permet d'étudier une population de neurones au sein d'un réseau de neurones mais en excitant spécifiquement les neurones souhaités avec une cible qui n'a rien de physiologique en terme d'expression, de conductance et de sélectivité ionique. Ceci limite l'interprétation des

résultats. En quelle mesure ce système biotechnologique peut-il mimer des conditions d'activation physiologiques ? Ce système est défaillant de ce côté là. Cependant, une alternative récente permet de photoréguler l'activité d'un canal potassique à l'aide d'une rhodopsine couplée aux protéines G (Caro et al 2012, Moreau et al 2008). Cette stratégie originale consiste à créer une protéine de fusion entre le canal potassique et la rhodopsine. Une illumination va provoquer des changements conformationnels au sein de la rhodopsine qui vont se répercuter sur les canaux potassiques qui se referment réversiblement.

L'optogénétique pharmacologique est une alternative qui permet de contrôler une population de neurone à l'aide d'une cible biologique précise, c.-à-d. par l'intermédiaire d'une pompe ionique, d'un récepteur canal ou métabotrope, photoactivables.

3.1.2. La pharmacologie optogénétique

3.1.2.1. Principe de fonctionnement

La pharmacologie optogénétique, introduite très récemment (Kramer et al 2013), se distingue de l'optogénétique microbienne par l'ingénierie d'une protéine transmembranaire dans le but de la contrôler par la lumière. L'optogénétique pharmacologique, aussi connue sous le nom de « Photoswitched Tethered Ligand (PTL) approach », est une stratégie qui peut potentiellement s'appliquer à tous les récepteurs canaux, canaux ioniques et les récepteurs métabotropiques (Fig. 15b).

Le principe de l'optogénétique pharmacologique est le suivant. Un ligand est covalamment attaché sur sa protéine cible, à proximité de son site de liaison, par l'intermédiaire d'un bras espaceur photoisomérisable. Pour atteindre cet objectif, la protéine est modifiée génétiquement pour porter un point de mutation, une cystéine. Cette dernière doit être judicieusement placée par rapport au site de fixation du ligand. La cystéine, appelée point de branchement, permet le marquage sélectif et irréversible du récepteur muté par le ligand photoisomérisable ou PTL. Le PTL possède un groupement réactif vis-à-vis des thiols permettant sa liaison covalente à la protéine, un

azobenzène photoisomérisable et pour finir, le ligand. L'azobenzène est connu pour s'interconvertir entre ses isomères étendu et court, dit *trans* et *cis* respectivement, sous l'action de la lumière. Cette propriété de l'azobenzène permet de contrôler la position relative du ligand par rapport à son site de fixation. En d'autres termes, un isomère concentre le ligand dans son site de fixation, tandis que l'autre isomère l'éloigne et le tient à distance, empêchant toutes interactions entre le ligand et la protéine marquée. Un tel système permet le contrôle spatiotemporel de l'activation ou de l'inhibition de la protéine ingénierée.

Détaillons maintenant la composition et les propriétés du ligand photoisomérisable.

Groupement thiol-réactif.

Le groupement thiol-réactif permet la liaison covalente du PTL à la protéine ciblée. Le groupement chimique sulfhydryl-réactif le plus utilisé est le maléimide. Cet électrophile faible se fera préférentiellement attaqué par le groupement sulfhydryle d'une cystéine qui est l'acide aminé naturel le plus nucléophile. Le groupement maléimide peut-être remplacé par d'autres groupements électrophiles tels que l' α -chloroacétamide et l'acrylamide. Ces deux derniers groupements sont nettement moins réactifs que le maléimide. Le maléimide s'hydrolyse à pH physiologique mais il est stable à pH acide.

Groupement photoisomérisable.

La seconde partie de la molécule contient un azobenzène qui permet la photoisomérisation du PTL. Les propriétés photochimiques de l'azobenzène peuvent être modulées en fonction de sa substitution. Classiquement l'azobenzène des PTLs est substitué en 4 et 4' par des groupements amides. Dans ce cas, une irradiation dans le proche UV à 380 nm provoque l'isomérisation *cis*, ou la transition *trans-cis*, de l'azobenzène. Le retour à l'isomère *trans*, ou transition *cis-trans*, se fait lentement thermiquement et rapidement sous irradiation dans le visible à 500 nm. L'isomère *trans* est la forme thermodynamiquement stable. Cependant, la lumière UV interagit

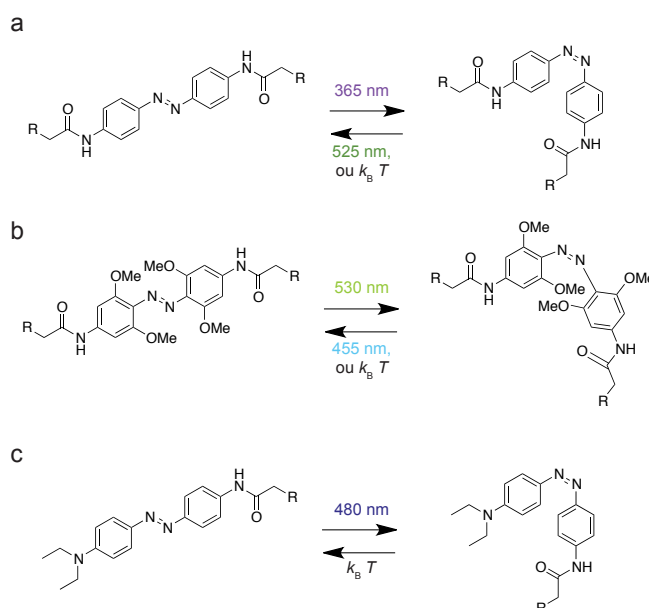
fortement avec les tissus biologiques (scattering). Ce phénomène atténue la puissance lumineuse incidente et rend l'UV toxique pour les cellules. L'utilisation d'une irradiation lumineuse dans l'UV est donc un frein pour une application *in vivo*. Pour surmonter ce problème il faut déplacer les longueurs d'ondes d'isomérisation vers le rouge, car cette longueur d'onde interagit faiblement avec les tissus biologiques.

Une substitution des positions 2-2' et 6-6' du diamidoazobenzène par des groupements méthoxy électro-donneurs, provoque un déplacement vers le rouge des longueurs d'ondes d'isomérisation. Les valeurs des longueurs d'onde d'isomérisation sont 530 nm pour la transition *trans-cis* et 455 nm pour la transition *cis-trans*. Cette substitution stabilise thermiquement les deux isomères (Beharry et al 2011).

Une autre alternative passe par la substitution d'un côté de l'azobenzène avec un groupement électro-attracteur et de l'autre par un groupement électro-donneur. Cette substitution permet de déstabiliser l'isomère *cis* qui retourne rapidement à l'isomère *trans* thermiquement (ordre de la milliseconde, à la seconde) et de décaler la longueur d'onde d'isomérisation *trans-cis* dans le rouge (470 nm). Le DENAQ en est l'exemple. L'azobenzène du DENAQ est substitué par un groupement diéthylamine fortement électro-donneur et par un groupement alkylamide moyennement électro-attracteur. Contrairement à l'azobenzène tétrasubstitué avec des groupements méthoxy, les substitutions du DENAQ permettent de ne pas modifier l'encombrement de l'azobenzène. (Mourot et al 2011). (Fig. 21).

Figure 21. Modification des propriétés photochimiques de l'azobenzène par substitution.

La substitution de l'azobenzène par des groupements électro. (a) Substitution classique, 4,4'-diamido, de l'azobenzène utilisé en neurosciences. (b) L'ajout de groupements électro-donneurs en 2,2' provoque un décalage vers le rouge de la longueur d'onde provoquant la transition *trans-cis*. (c) La substitution de l'azobenzène par un groupement électro-donneur d'un côté et par un groupement électro-attracteur de l'autre décale la longueur d'onde d'isomérisation *trans-cis* vers le rouge et déstabilise l'isomère *cis* qui retourne rapidement et thermiquement à l'isomère *trans*. (Banghart et al 2004, Beharry et al 2011, Mourot et al 2011).



Le ligand.

Le ligand peut être un agoniste, un antagoniste, un bloquant du canal ou même un modulateur allostérique. La modification chimique du ligand est une partie très sensible. Le ligand doit être modifié pour recevoir le bras espaceur photoisomérisable tout en gardant les mêmes propriétés pharmacologiques. La connaissance du mode de fixation du ligand dans son site s'avère donc primordiale pour orienter la synthèse organique du PTL. Ceci est d'autant plus vrai pour les ligands avec des structures relativement complexes tel que l'ATP.

3.1.2.2. Les différentes protéines transmembranaires contrôlées par la lumière.

3.1.2.2.1. Les canaux potassiques.

Les premiers canaux modifiés pour répondre à la lumière, sont les canaux potassiques voltage-dépendent nommés Shakers. La molécule qui fut utilisée pour contrôler l'activité des ces canaux fut appelée MAQ car elle contient un groupement maléimide, un azobenzène central et un groupement ammonium quaternaire, bloquant du canal. Le design du MAQ s'appuya sur une étude utilisant des bloqueurs, covalamment liés, de différentes longueurs (Blaustein et al 2000). Le canal K^+ photosensibilisé fut nommé « Synthetic Photoisomérisable Azobenzène-Regulated K^+ » (SPARK) (Banghart et al 2004). Le MAQ réagit avec une cystéine introduite dans une boucle extracellulaire localisée à proximité du canal. L'isomère *trans* du MAQ permet à l'ammonium quaternaire de rejoindre le canal et de le bloquer, tandis que l'isomère *cis* raccourcit le MAQ, empêchant l'ammonium quaternaire de bloquer le canal. Le SPARK permet de contrôler l'activité de neurones hippocampaux embryonnaires de rats (Fig. 22).

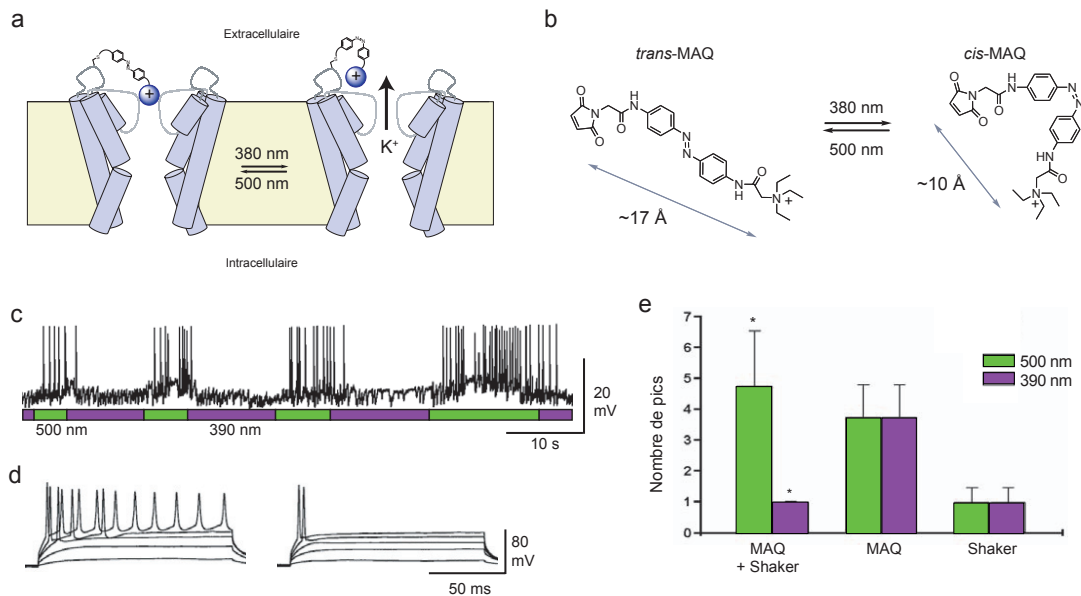


Figure 22. Développement du SPARK pour la photorégulation de l'activité des neurones. (a) Schéma du principe de photoactivation du SPARK. L'isomère *trans* bloque le passage des ions, tandis que l'isomère *cis* est trop court pour pouvoir bloquer le canal. (b) Structures des isomères *trans* et *cis* du maléimide-azobenzène-ammonium quaternaire (MAQ). (c, d, e) Photocontrôle de l'activité de neurones pyramidaux d'hippocampe de rat. (c) Les potentiels d'action sont inhibés à 390 nm et sont restaurés à 500 nm. (d) Expériences de dépolarisation en palier (-55 à -15 mV) produisant des potentiels d'action multiples à 500 nm (à gauche) et unique à 390 nm (à droite). (e) La génération de potentiel d'action, imposés par une dépolarisation à -15mV, est significativement modulée par la lumière dans les neurones exprimant le Shaker muté (E422C) après traitement au MAQ. Les neurones exprimant le canal sans traitement au MAQ et les neurones sans expression du canal traités au MAQ ne sont pas affectés par la lumière (Banghart et al 2004).

3.1.2.2.2. Les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR).

Développement d'un « light-gated iGluR ». (Fig.23 a, b et c).

Parmi les études structure-activité antérieures, le design du PTL s'appuya sur la structure cristallographique du domaine de fixation du ligand (LBD) du récepteur ionotrope du glutamate 6 (iGluR6) en complexe avec le (2S,4R)-4-méthylglutamate et sur les connaissances des propriétés pharmacologiques du (2S,4R)-4-allylglutamate, un agoniste de iGluR6. Dans une première étude (Volgraf et al 2006), les auteurs mirent au point un PTL appelé Maléimide-Azobenzène-Glutamate (MAG). Le traitement du simple mutant cystéine photosensibilisé par son couplage au MAG est appelé light-gated ionotropic glutamate receptor (LiGluR).

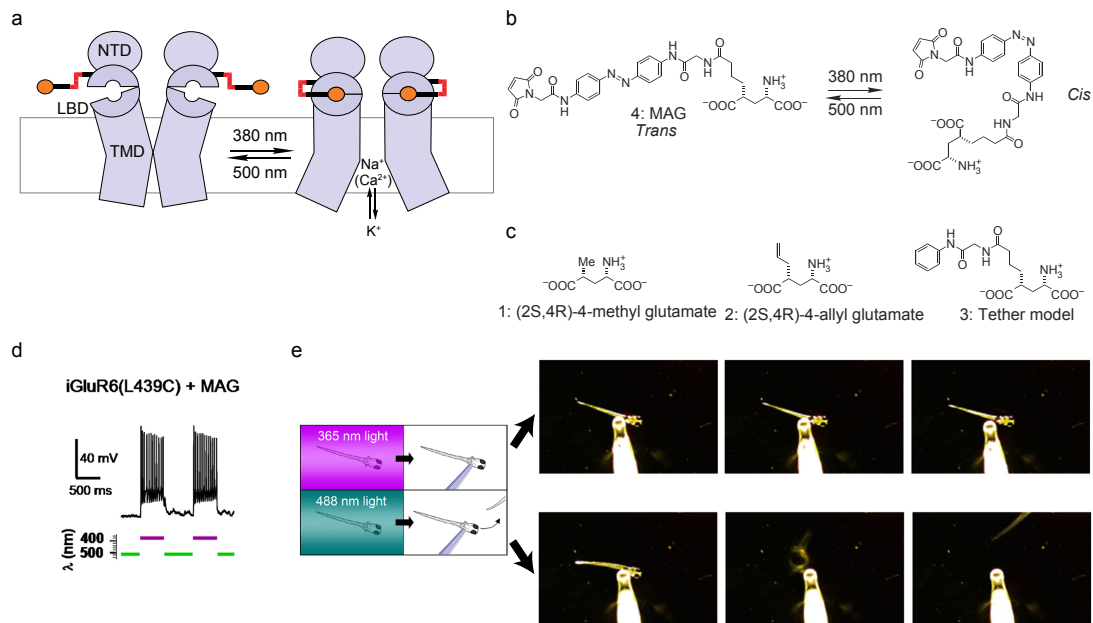


Figure 23. Développement du LiGluR pour la photorégulation de l'activité de neurones et la photorégulation du comportement du Poisson zèbre. (a, b, c) Développement du LiGluR. (a) Schéma du principe de photoactivation du LiGluR. La photoisomérisation réversible du maléimide-azobenzène-glutamate (MAG) lié au LBD permet d'ouvrir et de fermer le pore. (b) Structures des isomères *trans* et *cis* du MAG. (c) Structure chimique d'agonistes de iGluR6 qui ont permis d'orienter la synthèse du MAG. (d, e) (Szobota et al 2007) Application du LiGluR *in vitro* et *in vivo*. (d) Les neurones de l'hippocampe de rat exprimant le récepteur iGluR6 (L439C) et traités avec le MAG sont dépolarisés par une irradiation à 380 nm, provoquant la création de train de potentiels d'action caractéristiques de ces cellules. Une illumination à 500 nm permet de stopper les trains de potentiel d'actions et de repolariser la membrane. (e) Photocontrôle du comportement de fuite du poisson zèbre transgénique exprimant iGluR6 (L439C) après stimulation mécanique. La réponse au touché est perdue à 365 nm (en haut) et retrouvée après une illumination à 488 nm (en bas) (Volgraf et al 2006).

La structure cristallographique du domaine extracellulaire de iGluR6 révéla la présence d'un 'canal de sortie' persistant au niveau du LBD refermé après fixation du (2S,4R)-4-méthylglutamate. Ceci suggéra que l'isomère *cis* du MAG pourrait atteindre le « clamshell » sans empêcher sa fermeture. Cette hypothèse fut confirmée en étudiant le potentiel agoniste du 'tether model' qui est un glutamate alkylé ressemblant au (2S,4R)-4-allylglutamate avec comme partie alkyl un groupement mimant un demiazobenzène.

Ensuite le composé MAG fut synthétisé en suivant la synthèse présentée dans le schéma 1. Cette synthèse convergente consiste, dans un premier temps, à synthétiser le synthon 6 dans une réaction d'addition élimination de l'azodianiline sur une glycine activée avec un agent de couplage peptidique. D'autre part, le synthon 9 est obtenu par une réaction de métathèse des oléfines de Grubbs de l'ester méthylique de l'acide allyl pyroglutamique avec

l'acide acrylique. Dans une dernière phase, le MAG est obtenu par réaction d'addition élimination des synthons 6 et 9 suivi de l'ouverture de l'ester méthylique de l'acide pyroglutamique pour donner le glutamate. Le maléimide est généré à la dernière étape de synthèse avec le *N*-méthoxycarbonylmaléimide par catalyse acide.

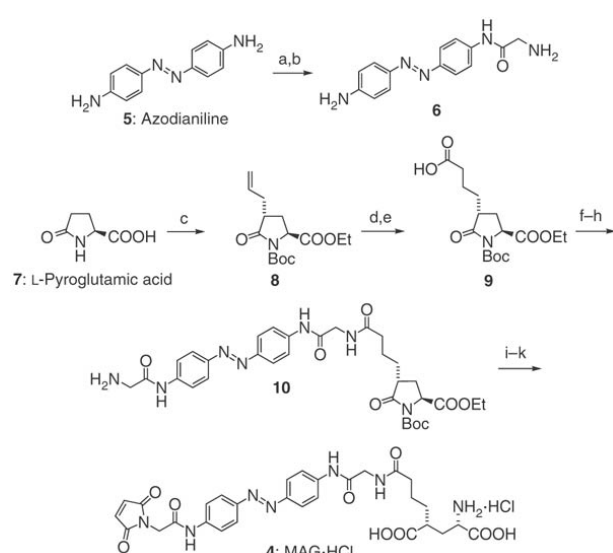


Schéma 1. Synthèse totale de MAG.

Réactifs et conditions : (a) Boc-Gly-OH, EDCI, HOBT, DIPEA (66%); (b) TFA, CH₂Cl₂ (98%); (c) voir (Ezquerro et al 1993); (d) acide acrylique, 5% catalyseur Grubbs de second-génération (92%); (e) H₂, Pd/C, MeOH (97%); (f) 6, EDCI, HOBT, DIPEA (97%); (g) Fmoc-Gly-OH, (COCl)₂, DMF; (h) pipéridine, DMF (43%, over two steps); (i) 1.0 M LiOH H₂O/THF, 0 °C (80%); (j) *N*-méthoxycarbonylmaléimide, NaHCO₃, THF/H₂O (71%) and (k) HCl-saturaté EtOAc (87%).

Boc, *t*-butoxycarbonyl; CH₂Cl₂, dichlorométhane; (COCl)₂, chlorure d'oxalyle; DIPEA, *N,N*-diisopropyléthylamine; DMF, *N,N*-diméthylformamide; EDCI, *N*-éthyl-*N'*-(3-diméthyl-diaminopropyl)-carbodiimide HCl;

EtOAc, ethyl acétate; Fmoc, 9-fluorenylméthoxycarbonyl; HOBT, hydrate de 1-hydroxybenzotriazole; MeOH, méthanol; Pd/C, palladium on carbon; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tétrahydrofurane. (Volgraf et al 2006)

L'exploration de sites de branchements potentiels se fit en mutant 11 résidus, localisés dans un périmètre délimité autour du canal de sortie, en cystéine. La meilleure photoréponse, évaluée par électrophysiologie patch-clamp sur cellule entière après conjugaison du composé MAG au récepteur, fut obtenue avec le mutant simple L439C.

Puis les longueurs d'ondes d'activation et de désactivation furent déterminées en testant une échelle de longueurs d'ondes sur des cellules HEK293 exprimant iGluR6-L439C après couplage du MAG et en évaluant le niveau d'activation du récepteur par électrophysiologie 'patch clamp' sur cellule entière (fig. 24). L'activation maximale du récepteur se fait comme attendu, à 380nm et la plus importante désactivation à 500 nm, ces valeurs correspondant respectivement aux isomères *cis* et *trans* du PTL. Il fut remarqué que le degré d'activation du récepteur est fonction de la longueur d'onde appliquée.

En créant un LiGluR, les auteurs ouvraient la voie pour appliquer la stratégie PTL aux autres récepteurs canaux.

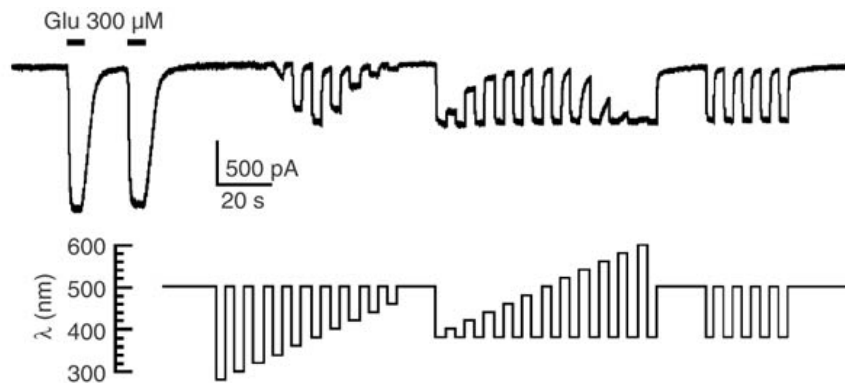


Figure 24. Détermination des longueurs d'ondes optimales de modulation du photoswitch. Enregistrement patch-clamp en mode cellule entière sur les cellules HEK293 exprimant iGluR6-L439C après conjugaison du MAG. L'irradiation lumineuse à de courtes longueurs d'ondes (280-480nm, avec un incrément de 20 nm) donne une activation maximale à 380nm. L'irradiation lumineuse à de grandes longueurs d'ondes (400-600nm, avec un incrément de 20nm) donne une désactivation maximale à 500nm. L'alternation entre une illumination à 380nm et à 500nm évoque une réponse reproductible. (Volgraf et al 2006)

Dans une étude postérieure (Gorostiza et al 2007), le mécanisme d'activation de LiGluR fut étudié plus en détail.

Dans un premier temps, l'équilibre entre les isomères *cis* et *trans* du PTL fut quantifié par RMN. A 380 nm environ 93% du MAG est dans l'isomère *cis* et à 500 nm environ 83% est dans l'isomère *trans*. Ces paramètres sont très importants car ils conditionnent, en partie, l'efficacité de la photorégulation.

Puis, la concentration effective du composé MAG au niveau du site de fixation du ligand fut évaluée par compétition avec l'antagoniste DNQX qui se fixe au niveau du site de fixation du ligand (LBD) et empêche sa fermeture. La concentration locale effective de glutamate libre en solution mimée par l'isomère *cis* de MAG est de 12 mM, démontrant que l'isomère *cis* force le ligand à rester dans son site de liaison.

Enfin, un MAG rallongé (avec une glycine entre le groupement azobenzène et le glutamate terminal) appelé MAG-2, fut aussi testé pour mettre en évidence l'effet de la longueur du photoswitch sur son pouvoir d'activation. La photoréponse de MAG-2 est environ deux fois moins importante que celle de MAG. Cette longueur est importante, mais elle est directement corrélée avec la distance entre le site de liaison du ligand et la cystéine, suggérant qu'une autre

position d'ancrage de MAG-2 sur la protéine rendrait sa photoactivation efficace et entraînerait diminution d'efficacité de MAG-1.

LiGluR *in vivo* (Fig. 24 d, e).

Dans un premier temps, la régulation par la lumière de l'activité des neurones fut étudiée sur des neurones postnataux de l'hippocampe en culture. Les neurones furent cotransfectés avec iGluR6 (L439C) et la GFP, puis marqués avec MAG. Seuls les neurones exprimant le récepteur exogène présentèrent une sensibilité à la lumière avec une dépolarisation à ~380 nm déclenchant un train de potentiels d'action (PA) et une inhibition de la dépolarisation à ~500 nm. L'absence de réponse des neurones n'exprimant pas iGluR6 (L439C) s'explique par l'inexistence d'une cystéine à proximité du point de branchement chez les iGluRs natifs.

Le composé MAG ne présente pas de toxicité manifeste. Cette dernière fut évaluée en appliquant sur les neurones différentes concentrations de MAG pendant 12 h.

Dans une seconde phase, fut étudiée la photoréponse des neurones exprimant LiGluR6 dans le poisson zèbre. Pour cela, les auteurs créèrent une lignée de poissons zèbres doublement transgéniques exprimant le récepteur iGluR6 (L439C). Les iGluRs s'expriment généralement dans les neurones impliqués dans la sensation du toucher (ganglion du trijumeaux, rhombencéphale et cellules de Rohon-Beard), il serait donc possible de savoir s'il y a ou non régulation de l'activité des neurones par la lumière en évaluant le comportement des larves de poissons zèbres, le toucher provoquant le déplacement de la larve. Deux autres comportements furent étudiés : la nage libre impliquant un système moteur intact et la réponse optomotrice nécessitant une coordination entre le système visuel et les fonctions motrices. Après incubation dans une solution contenant MAG et 15 min d'irradiation (de faible intensité) à 365 nm, toutes les larves présentèrent un comportement altéré. Concernant la réponse au toucher : 28% des larves (27 sur 96 poissons) ne réagirent pas au toucher et 22 de ces 27 poissons retrouvèrent une réaction au toucher après 30 s d'illumination à 488 nm.

Cette étude démontre la capacité de LiGluR6 à contrôler le comportement animal, cependant l'expression de LiGluR6 n'est pas ciblée. L'activation d'une multitude de neurones entraîne alors une paralysie de la larve sous une illumination à 365 nm qui est diffuse (lampe UV).

Deux ans plus tard, la même équipe disséqua le mécanisme de locomotion chez le poisson zèbre, dans une étude utilisant l'expression ciblée de LiGluR6 (Wyart et al 2009). Tout cela avec un système de lumière focalisée (source lumineuse couplée à un microscope). Les auteurs démontrèrent ainsi la capacité de la stratégie PTL à identifier le degré d'implication de différentes populations de neurones dans une voie de signalisation *in vivo*, c.-à-d. dans un réseau de neurones complexe.

3.1.2.2.3. Les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine et du GABA_A.

Le premier récepteur nicotinique de l'acétylcholine (nAChR) photoactivable, fut obtenu avant que les manipulations génétiques sur les récepteurs canaux ne soient possibles et 24 ans avant la mise au point du SPARK. Ceci pu se faire grâce à la présence d'un pont disulfure endogène situé dans la poche de fixation de l'acétylcholine. Après réduction de ce pont disulfure, une des cystéines libérées put réagir avec le Q-Br, un dérivé azobenzène qui porte d'un côté un groupement électrophile bromométhyle et de l'autre un ammonium quaternaire (Lester et al 1980). Cependant cette stratégie ne permet pas de contrôler spécifiquement un sous-type de nAChR. Récemment, la stratégie PTL permit d'activer ou d'inhiber les hétéromères $\alpha 3\beta 4$ et $\alpha 4\beta 2$ des nAChRs (Fig. 25). Basé sur les connaissances pharmacologiques et structurales des nAChRs, les auteurs synthétisèrent un dérivé maléimide-azobenzène-acétylcholine (MAACh) agoniste et un dérivé maléimide-azobenzène-homocholine (MAHoCh) antagoniste. Ces deux molécules réagissent avec une cystéine introduite sur les sous-unités β à proximité de la poche de fixation de l'acétylcholine située sur les sous-unités α pour donner un light-gated nAChR (LiAChR). Les isomères *cis* du MAACh et du MAHoCh permettent à leur ligand

respectif de rejoindre réversiblement le site de liaison de l'acétylcholine et d'activer ou d'inhiber l'activité du LiAChR (Tochitsky et al 2012). Le récepteur photo-inhibé permettrait de savoir si le récepteur est impliqué dans une voie de signalisation physiologique et le récepteur photo-activé permettrait de savoir si le récepteur est suffisant pour induire l'effet physiologique (Kramer et al 2013). Dans ce dernier article de revue, les auteurs révèlent qu'ils possèdent un récepteur du GABA_A photo-inactivable (LiGABA_AR) non publié.

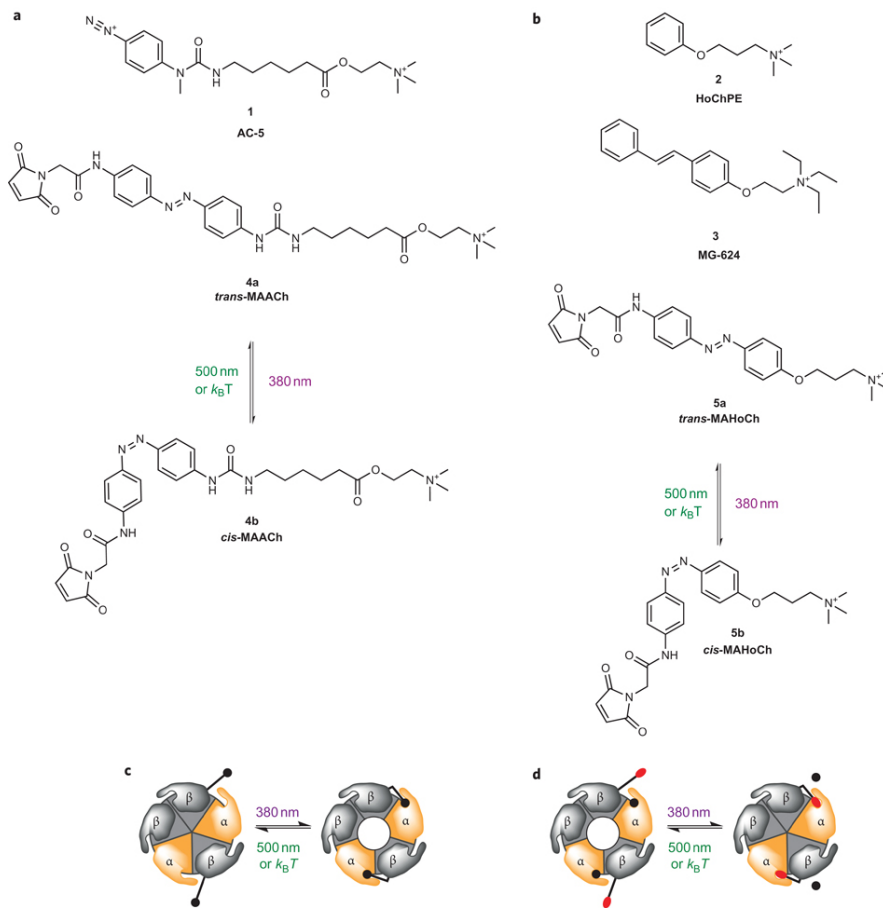


Figure 25. Design de ligands photoisomérisables pour le photocontrôle des nAChRs. (a, b) Développement de PTLs pour les nAChRs (a) Structure de (1) l'AC5, marqueur de photoaffinité des nAChRs et du (4a) *trans*- et (4b) *cis*-maléimide-azobenzène-acylcholine (MAACh), agoniste photoisomérisable des nAChRs. (b) Structure de (2) l'homocholine phényl ether (HoChPE), agoniste des nAChRs, (3) de l'antagoniste MG-624 et du (5a) *trans*- et (5b) *cis*-maléimide-azobenzène-homocholine (MAHoCh), antagoniste photoisomérisable des nAChRs. Les PTLs passent d'une configuration *trans* à *cis* sous irradiation à 380 nm et recouvrent la configuration *trans* à 500 nm. (c) L'isomérisation à 380 nm, du PTL agoniste, active les nAChRs. Une irradiation à 500 nm désactive le récepteur (d) L'isomérisation à 380 nm, du PTL antagoniste, bloque les nAChRs, en inhibant la fixation de l'acétylcholine (cercle noir). Une irradiation à 500 nm libère le site de fixation de l'acétylcholine, celle-ci peut activer le récepteur. k_B = constante de Boltzmann. (Tochitsky et al 2012)

3.1.2.2.4. Les récepteurs métabotropiques du glutamate.

Cette année, les mêmes équipes qui mirent au point SPARK, LiGluR, LiAChR, s'attaquent aux récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs) et créent deux récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) activé et inhibé par la lumière (Fig. 26). Ces récepteurs sont nommés light-agonized/antagonized mGluR (LimGluR). Le point fort de cette stratégie par rapport à l'optogénétique microbienne, est qu'elle permet de garder un récepteur fonctionnel, activé par les neurotransmetteurs, qui ne perturbera pas de manière irréversible l'équilibre physiologique du sujet d'étude.

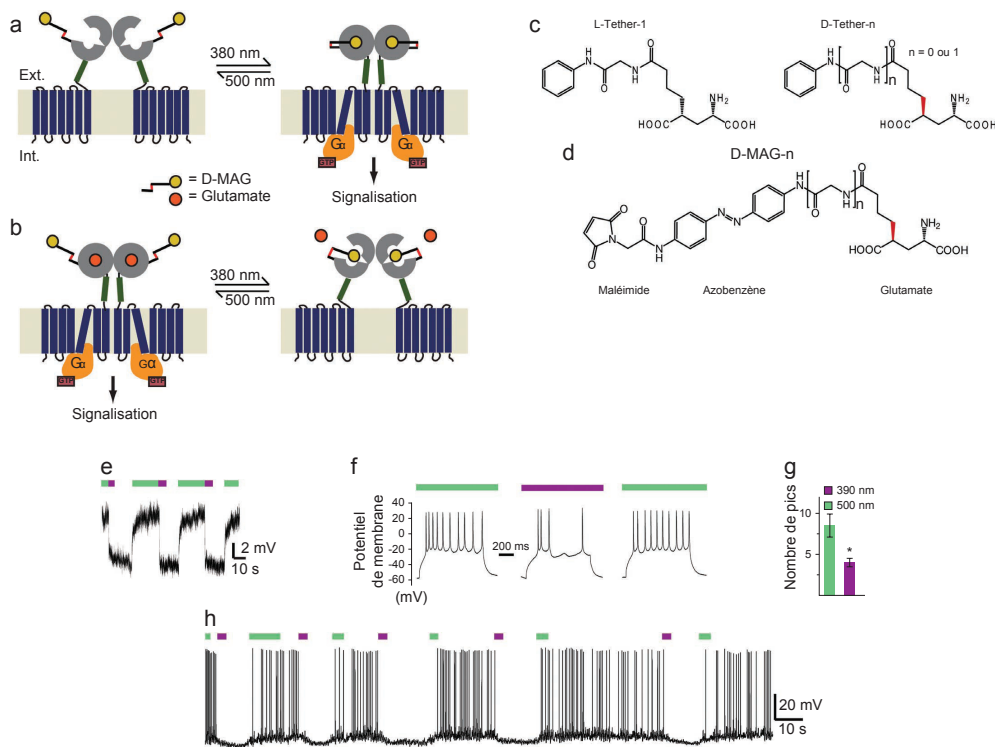


Figure 26. Développement du LimGluR pour le photocontrôle de l'activité neuronale. (a) LimGluR activé par l'isomère *cis* du D-MAG-0 sous illumination à 380 nm. Une illumination à 500 nm permet le retour à l'isomère *trans* et d'inactiver le récepteur. (b) LimGluR marqué avec le D-MAG-1, l'isomère *cis* permet au ligand de rejoindre son site de liaison. Le ligand, rallongé d'une unité glycine, provoque un encombrement stérique qui empêche la bonne fermeture du LBD. Le D-MAG-1 est dans ce cas un antagoniste (c) Structures chimiques de « tether models » pour orienter la synthèse des D-MAG-1 et 2. Les « tether models » sont des demi-PTL servant à évaluer l'effet de la modification chimique sur les propriétés pharmacologiques du ligand. (d) Structure chimique du maléimide-azobenzène-D-glutamate, D-MAG-n (n = 0 ou 1). (e, f, g, h) LimGluR2 permet le photocontrôle de l'excitabilité neuronale dans des tranches d'hippocampe de rat. (e) Hyperpolarisation provoquée par une illumination à 390 nm (barre violette) et réversée à 500 nm (barre verte). (f) Activité neuronale (tranche d'hippocampe en culture, enregistrements patch-clamp en configuration whole-cell) provoquée par des injections de courant à 200 pA pendant 1s durant une illumination à 500 nm ou à 390 nm. L'activation réversible de LimGluR2 diminue le nombre de pics de dépolarisation. (g) Résumé des données obtenues dans l'expérience précédente. Une illumination à 390 nm réduit significativement l'activité neuronale (paired, one-tailed t test, P = 0,024, n = 6), les barres d'erreur représentent le s.e.m. (h) Trace représentative de l'inhibition réversible de l'activité spontanée des neurones par l'intermédiaire de LimGluR2. (Levitz et al 2013)

L'optogénétique pharmacologique permet le contrôle d'une large gamme de protéines transmembranaires, ce qui fait sa force. Malgré tout, cette stratégie possède un point faible, en passant outre le développement de la cible photocontrôlable. Le PTL est une molécule synthétique qui n'est pas naturellement présente dans les tissus biologiques. Cette stratégie nécessite donc de procéder à un marquage de la cible en appliquant le PTL dans les tissus étudiés, soulevant des problèmes d'administration et de toxicité éventuels, inhérents à toutes les molécules pharmacologiques.

Le point fort de l'optogénétique pharmacologique par rapport à l'optogénétique microbienne est de pouvoir contrôler une population de neurones par l'intermédiaire d'une protéine transmembranaire précise. Cette stratégie permet de révéler l'implication d'une cible endogène dans un phénomène biologique étudié, tel la locomotion chez le poisson zèbre (Wyart et al 2009).

A ce jour, cette stratégie n'a pas été appliquée aux récepteurs P2X. Un tel outil permettrait de faire de nouvelles découvertes sur le rôle physiopathologique de ces récepteurs.

4. Objectif de thèse et stratégies déployées.

L'objectif de cette thèse est le développement d'outils optogénétiques pour contrôler l'activité des récepteurs P2X. Le projet initial était de mettre au point un PTL pour activer réversiblement les récepteurs rP2X2 à l'aide de la lumière. Le choix de rP2X2 s'est fait pour des raisons électrophysiologiques, ses récepteurs présentant des courants stables non désensibilisants. L'agoniste de référence des récepteurs rP2X2 étant l'ATP, le PTL à développer était le maléimide-azobenzène-ATP.

Ces travaux se divisent en trois parties, la première est l'identification du site de fixation de l'ATP par marquage d'affinité en utilisant une sonde ATP thiol-réactive. La connaissance du mode de fixation de l'ATP dans son site étant nécessaire pour l'élaboration d'un PTL ATP. La seconde partie concerne la création d'un « light-gated P2XR » (LiP2XR). Cette partie comprend la mise au point du PTL analogue de l'ATP et l'identification du point d'ancrage du PTL sur la protéine, c.-à-d. l'identification d'acides aminés à muter en cystéine. La troisième partie est le développement d'une stratégie innovante de contrôle des récepteurs P2X par la lumière, alternative à celle des PTLs, qui permet de s'affranchir des étapes de modification du ligand.

Les moyens techniques à disposition sont des outils bioinformatiques, le matériel de synthèse organique, la technologie d'électrophysiologie Patch-clamp et les outils de culture cellulaire associés.

Nous allons voir en quoi l'association de la chimie organique avec la biologie est une force pour la mise au point d'outils puissants d'étude de la chimie du vivant, la biologie.

5. Identification du site fixation de l'ATP sur les récepteurs P2X.

L'identification du site de fixation de l'ATP et du mode de fixation de l'ATP dans son site est nécessaire pour mettre au point un PTL analogue de l'ATP.

Contexte.

La structure cristallographique du récepteur zfp2X4 (Kawate et al 2009), résolue en absence d'ATP, dans un état fermé, permet de révéler la proximité spatiale de résidus, identifiés une dizaine d'années auparavant par des campagnes de mutagenèse dirigée, impliqués dans l'affinité et l'efficacité de l'ATP (Evans 2010). Cependant ces données n'apportent pas de preuves directes permettant de localiser avec certitude le site de fixation de l'ATP.

Stratégie.

Pour identifier le site de fixation de l'ATP nous avons utilisé la technologie du marquage d'affinité dirigé inventée par l'équipe du professeur Maurice Goeldner. Cette stratégie consiste, d'une part, en l'introduction de mutations cystéine par mutagenèse dirigée, point par point, dans un site de fixation putatif du ligand et d'autre part en l'ingénierie du ligand avec substitution de la position par un groupement thiol-réactif. Le groupement réactif doit être placé de sorte à garder un ligand affiné pour son récepteur, avec les mêmes propriétés pharmacologiques que le ligand endogène. Seule une proximité de l'ordre de quelques angströms (3-5 Å) entre le mutant cystéine et le groupement réactif du ligand permet un marquage covalent du site de liaison par le ligand. Cette stratégie permet d'identifier directement les résidus en contact étroit avec le ligand.

Résultats.

La molécule qui fut utilisée pour le marquage d'affinité des récepteurs P2X2, synthétisé par le Dr. Alexandre Specht, est le 8-thiocyano-adénosine-5'-triphosphate (NCS-ATP, Fig. 27b). Cette molécule possède la particularité de réagir avec une cystéine et de former un pont disulfure. Les ponts disulfures peuvent être réduits par des agents comme le DTT. Cette propriété permet d'avoir un marquage réversible (Fig. 27a). Dans un premier temps nous avons évalué le caractère agoniste du NCS-ATP pour les récepteurs rP2X2. Le NCS-ATP est un agoniste entier de rP2X2 (Fig. 27c). Son affinité apparente pour rP2X2 est plus faible que l'ATP mais son efficacité est plus élevée ($CE_{50} = 38 \pm 3 \mu\text{M}$, $I_{max} = 1,0$ pour l'ATP ; $CE_{50} = 132 \pm 16 \mu\text{M}$, $I_{max} = 1,6 \pm 0,2$ pour le NCS-ATP).

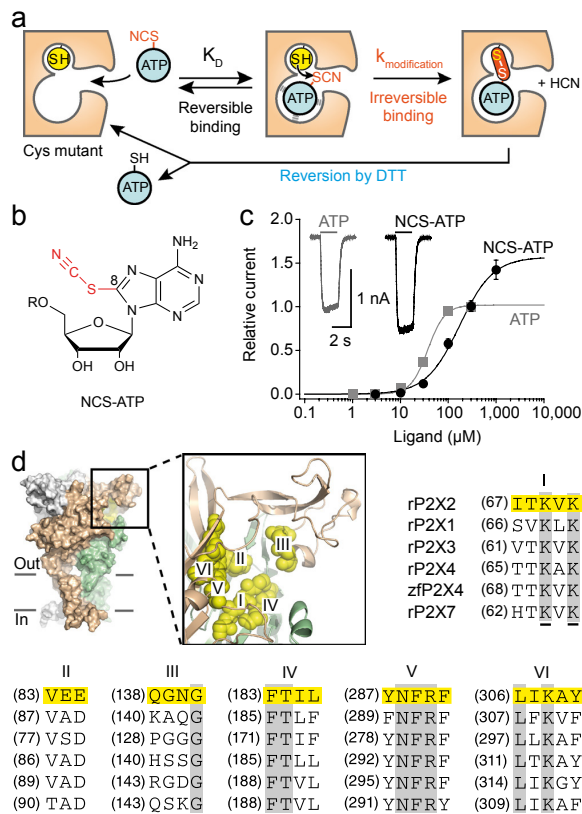


Figure 27. Stratégie d'identification du site de fixation de l'ATP des récepteurs P2X. (a) Représentation schématique de la stratégie. (b) Structure chimique du NCS-ATP, $R = (P_3O_9)^{4-}$. (c) Courbe dose réponse de P2X2 type sauvage (ATP: $CE_{50} = 38 \pm 3 \mu\text{M}$, $n_H = 2,6 \pm 0,1$, $I_{max} = 1$, $N = 7$; NCS-ATP: $CE_{50} = 132 \pm 16 \mu\text{M}$, $n_H = 1,6 \pm 0,2$, $I_{max} = 1,4 \pm 0,2$, $N = 7$). (Encart) Enregistrement électrophysiologique, sur les mêmes cellules, pour $100 \mu\text{M}$ d'ATP et 1 mM d'NCS-ATP. (d) Résidus mutés en cystéine (jaune) sur le modèle tridimensionnel du récepteur P2X2. Chaque sous-unité est représentée d'une couleur différente. Alignement de séquence des zones étudiés (I à VI) du rat (r) P2X1-P2X4 et P2X7 et du poisson zèbre (zf) de P2X4. Les résidus identifiés, précédemment, comme importants dans le maintien de la réponse ATP sont soulignés. Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Ensuite, nous avons choisi 26 résidus, à muter en cystéine, localisés dans la cavité putative de fixation de l'ATP à l'aide d'un modèle par homologie de rP2X2 construit à partir de la récente structure cristallographique des récepteurs zfP2X4 dans un état fermé (Kawate et al 2009)(Fig. 27d). Puis, chacun des mutants cystéine fut testé dans une campagne de marquage d'affinité par électrophysiologie patch-clamp avec le protocole suivant. Une

solution de NCS-ATP (30 μ M, 2 min) fut appliquée sur des cellules HEK 293 exprimant chaque simple mutant cystéine. Après cinq minutes de lavage, les courants provoqués par l'ATP (\sim CE₅₀) sont mesurés et comparés avec ceux mesurés avant traitement (Fig. 28).

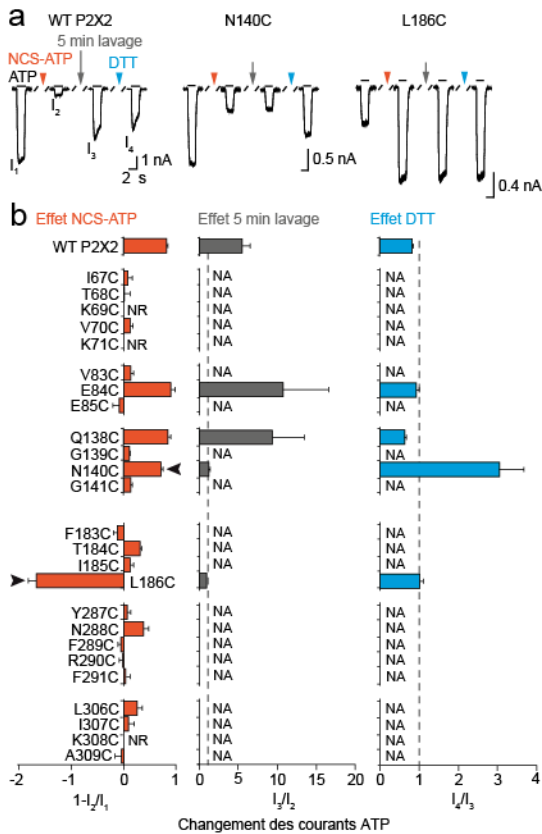


Figure 28. Marquage covalent au NCS-ATP des mutants N140C et L186C. (a) Traces représentatives du protocole de criblage. Courant provoqué par l'ATP sur P2X2 type sauvage (30 μ M), N140C (100 μ M) et L186C (1 mM). Avant et après traitement au NCS-ATP (30 μ M, 2 min, flèches rouges), après un lavage de 5 min (flèches grises) et après une application de DTT (10 mM, 10 s, flèches bleues). (b) Synthèse des résultats du criblage pour P2X2 type sauvage et pour chaque mutant cystéine (N=3-8); NR, pas de réponse; NA, non analysable à cause de l'absence d'effet du NCS-ATP (l'effet est pris en compte lorsqu'il y a une modification de la réponse ATP $> \pm 0,5$). Les flèches noires indiquent les résidus marqués.

Parmi les 26 mutants cystéine, deux résidus ont été identifiés, le N140C et le L186C. Le marquage a des effets complètement opposés suivant le résidu. Le traitement du mutant N140C au NCS-ATP abolit complètement la réponse ATP, tandis que le marquage du mutant L186C provoque une forte potentialisation des courants ATP. La réponse ATP est restaurée après une application de DTT (10 mM, 10 s pour N140C et 30 s pour L186C), confirmant le marquage des résidus cystéine et révélant l'accessibilité du pont disulfure formé entre le ligand et le récepteur (Fig. 28a). La prévention du marquage, par le NCS-ATP, des résidus N140C et L186C par protection pharmacologique avec l'ATP et un antagoniste compétitif, le TNP-ATP, permet de confirmer que le marquage d'affinité eut lieu dans le site de fixation de l'ATP (Fig. 29).

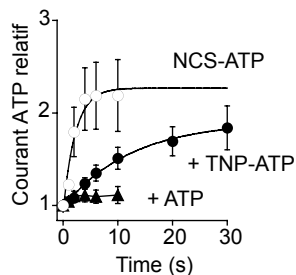


Figure 29. Prévention du marquage du L186C par protection pharmacologique. Potentialisation par le NCS-ATP (30 μ M) en absence ou en présence de TNP-ATP (300 μ M) ou d'ATP (3 mM) (N = 4-5).

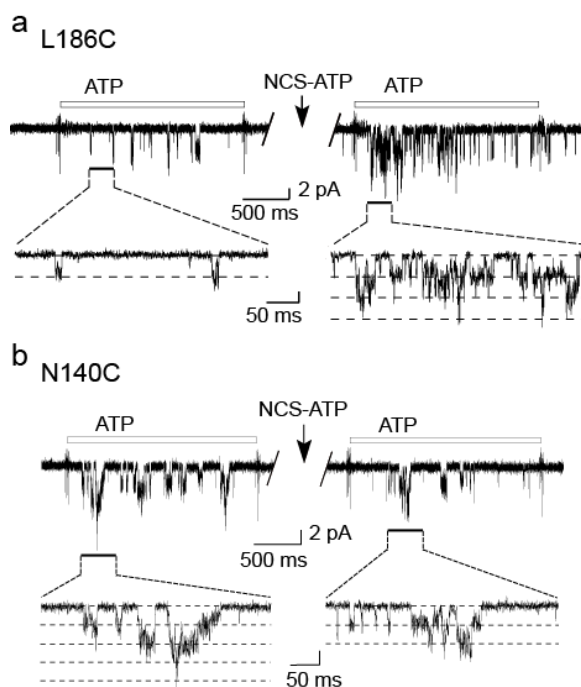


Figure 30. Expériences en canal unique sur P2X2 L186C et N140C. (a) Potentialisation ($604 \pm 164\%$ du contrôle, N = 7) par le NCS-ATP (10 μ M, 10 s) de la probabilité d'ouverture nominale des récepteurs activés par l'ATP (30 μ M, 2 s, indiquée par la barre blanche) sur le mutant L186C. La conductance unitaire de canal, avant et après traitement au NCS-ATP, est de $25,1 \pm 2,1$ et $24,7 \pm 2,3$ pS (N = 7). (b) Inhibition ($41 \pm 14\%$ du contrôle, N = 6, configuration outside-out) par le NCS-ATP (100 μ M, 10 s) de la probabilité d'ouverture nominale des récepteurs activés par l'ATP (10 μ M, 2 s, indiquée par la barre blanche) sur le mutant N140C. La conductance unitaire de canal, avant et après traitement au NCS-ATP, est de $22,8 \pm 2,2$ et $25,5 \pm 2,8$ pS (N = 6).

La mutation individuelle des positions N140 et L186 en résidus aromatiques (N140W et L186F) potentialise la réponse ATP, suggérant une interaction π - π entre les résidus aromatiques de substitution et le cycle de l'adénine de l'ATP et donc une interaction directe de ces résidus avec l'ATP. Pour finir cette étude, nous avons montré au travers d'expériences d'électrophysiologie patch-clamp sur canal unique, en configuration outside-out, que la liaison irréversible du NCS-ATP sur les positions N140C et L186C

ne provoque pas d'elle même l'activation spontanée du récepteur (Fig. 30). Ces expériences démontrent aussi que l'inhibition de la réponse ATP après marquage du N140C est due à une diminution de la probabilité nominale d'ouverture des récepteurs (NP_o , inhibition de $41 \pm 14\%$), sans modifier la conductance unitaire du canal, en présence d'ATP (10 μ M, 2 s). Le marquage du L186C n'affecte pas non plus la conductance unitaire du canal, mais augmente drastiquement la NP_o en présence d'ATP (30 μ M, 2 s), provoquant la potentialisation de la réponse ATP.

Cette étude apporta la preuve directe que la cavité située à l'interface entre les sous-unités constitue le site de liaison de l'ATP. Nous avons révélé que l'adénine du NCS-ATP est proche de deux résidus nouvellement identifiés, le N140C et le L186C et que ces résidus pourraient contribuer à la fixation de l'ATP.

Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor

Ruotian Jiang ^a, Damien Lemoine ^a, Adeline Martz ^a, Antoine Taly ^a, Sophie Gonin ^a, Lia Prado de Carvalho ^a, Alexandre Specht ^b, and Thomas Grutter ^{a,1}

^aLaboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, Unité Mixte de Recherche 7199, Centre National de la Recherche Scientifique, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France; and ^bLaboratoire de Chimie Bioorganique, Unité Mixte de Recherche 7199, Centre National de la Recherche Scientifique, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France

Edited by Eric Gouaux, Oregon Health and Science University, Portland, OR, and approved April 15, 2011 (received for review February 8, 2011)

ATP-gated P2X receptors are trimeric ion channels, as recently confirmed by X-ray crystallography. However, the structure was solved without ATP and even though extracellular intersubunit cavities surrounded by conserved amino acid residues previously shown to be important for ATP function were proposed to house ATP, the localization of the ATP sites remains elusive. Here we localize the ATP-binding sites by creating, through a proximity-dependent “tethering” reaction, covalent bonds between a synthesized ATP-derived thiol-reactive P2X2 agonist (NCS-ATP) and single cysteine mutants engineered in the putative binding cavities of the P2X2 receptor. By combining whole-cell and single-channel recordings, we report that NCS-ATP covalently and specifically labels two previously unidentified positions N140 and L186 from two adjacent subunits separated by about 18 Å in a P2X2 closed state homology model, suggesting the existence of at least two binding modes. Tethering reaction at both positions primes subsequent agonist binding, yet with distinct functional consequences. Labeling of one position impedes subsequent ATP function, which results in inefficient gating, whereas tethering of the other position, although failing to produce gating by itself, enhances subsequent ATP function. Our results thus define a large and dynamic intersubunit ATP-binding pocket and suggest that receptors trapped in covalently agonist-bound states differ in their ability to gate the ion channel.

affinity labeling chemical modification purinergic receptor

Author contributions: T.G. designed research; R.J., D.L., A.M., A.T., S.G., and A.S. performed research; L.P.d.C. contributed new reagents/analytic tools; R.J., D.L., and T.G. analyzed data; and T.G. and R.J. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence may be addressed. E-mail: grutter@unistra.fr or grutter@bioorga.u-strasbg.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1102170108/-DCSupplemental.

Discussions et perspectives.

Dans cette étude nous avons identifié de manière directe le site de fixation de l'ATP. Étonnamment nous avons identifié par marquage d'affinité deux résidus (N140C et L186C) séparés de 18 Å. Cette observation pourrait suggérer que l'ATP se fixe avec deux orientations différentes dans son site et/ou que la liaison de l'ATP change considérablement la structure du site.

Après réaction complète du NCS-ATP sur les résidus N140C et L186C, l'ATP est encore capable de se fixer et d'activer le récepteur. Ceci s'explique par le marquage partiel du récepteur, dont un ou deux sites sont marqués, laissant un ou deux sites libres. Cette hypothèse est en accord avec une étude en canal unique montrant que seuls les récepteurs complètement ligandés s'ouvrent (Ding & Sachs 1999b). Ces observations sont en accord avec le fait que les récepteurs sont des protéines allostériques coopératives. En d'autres termes, la fixation d'un agoniste dans un site va provoquer des changements de conformation qui vont se répercuter au site voisin, le rendant plus affiné pour le ligand. Ainsi, le marquage du L186C d'un site par le NCS-ATP, agoniste du récepteur, va modifier par allostérie le site voisin et changer la position relative de la cystéine par rapport au groupement réactif du NCS-ATP, la rendant inaccessible.

L'état du récepteur rP2X2 L186C piégé avec le NCS-ATP pourrait être un état partiellement ligandé précédant un état actif complètement ligandé. L'état du récepteur rP2X2 N140C piégé pourrait être un état intermédiaire de courte vie précédant l'état bloqué avec la position L186C ou un état inactif post-activation désensibilisé, dans lequel le ligand est encore fixé dans son site tandis que le canal est fermé. Ces hypothèses pourraient être confrontées à d'éventuelles expériences de cristallisation.

La récente résolution de la structure cristallographique du récepteur zfP2X4 dans un état actif en présence d'ATP, confirme la proximité du résidu L191 (homologue de L186) avec le cycle de l'adénine (Fig. 11b). Cet état actif est un état dans lequel les sites ATP sont totalement occupés. L'identification d'états intermédiaires pourrait concourir à l'élucidation de la séquence d'activation/inactivation des récepteurs P2X.

6. Elucidation du mécanisme d'ouverture des récepteurs P2X.

La connaissance des mouvements sous-tendant l'activation des récepteurs P2X suite à la fixation de l'ATP pourrait apporter des données substantielles à l'élaboration d'un récepteur activé par la lumière.

Contexte.

Au commencement de cette étude, la structure cristallographique des récepteurs P2X en présence d'ATP dans un état actif n'existait pas. Les mouvements induits par la fixation de l'ATP conduisant à l'ouverture du canal étaient alors inconnus. Le site de fixation de l'ATP était identifié dans une cavité ressemblant à une mâchoire située entre la tête d'une sous-unité et la nageoire dorsale d'une autre. Cette observation entraînait les questions suivantes : est-ce que cette mâchoire se referme suite à la fixation du ligand, à la manière d'un « venus flytrap », comme c'est le cas pour le LBD des iGluRs ? Est-ce que cette fermeture produit à son tour l'ouverture du canal ? *In silico*, le Dr. Antoine Taly démontrait par des expériences d'analyse en modes normaux (NMA, pour normal mode analysis) que la fermeture du site est un mouvement naturel qui s'opère dans les récepteurs rP2X2. La seconde étape était de démontrer, sur un système biologique *in vitro*, que cette fermeture du site est provoquée par la fixation de l'ATP et que ce mouvement provoque l'ouverture du canal.

Stratégie.

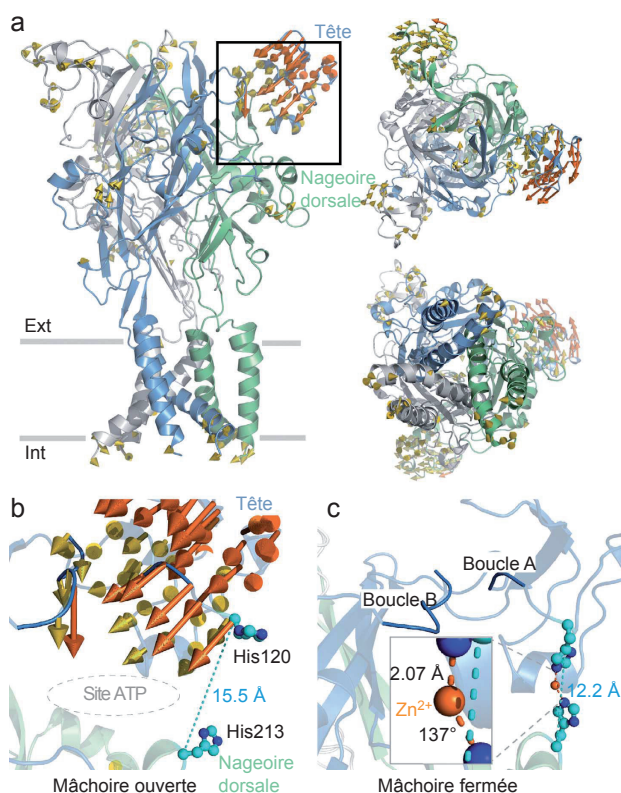
Pour identifier les mouvements moléculaires au sein de la protéine nous avons eut recourt, dans un premier temps, à des analyses en modes normaux (NMA). Ces expériences consistent, grossièrement, à apporter de l'énergie à la protéine sous forme de chaleur pour observer des mouvements moléculaires qui lui sont inhérents.

La seconde partie de cette étude fut basée sur des expériences d'ingénierie de site zinc. La chélation du zinc entre deux histidines nécessite que les deux histidines se rapprochent étroitement. Nous avons utilisé cette propriété pour

démontrer de manière directe le rapprochement de différentes parties de la protéine.

Résultats.

Des expériences d'analyse en modes normaux, consistant à réduire le récepteur rP2X2 (modèle par homologie) à son essence physique, c.-à-d. à un réseau élastique constitué des atomes C α de la protéine où chaque liaison inter-atome du squelette protéique est assimilée à un simple ressort, permirent de mettre en évidence des mouvements qui s'opèrent naturellement dans la protéine. Ces expériences ont révélé une mobilité importante du site de fixation de l'ATP, qui se referme permettant la chélation du zinc au niveau des histidines H120 et H213 (Fig. 31). Les NMA n'ont pas permis d'observer d'ouvertures significatives du canal en corrélation avec la fermeture du site ATP, cela même en perturbant les modes de NMA avec la présence d'une molécule d'ATP dans chacun des trois sites. Cette tendance de fermeture, une fois révélée, soulevait les questions suivantes. Est-ce que ce mécanisme de fermeture du site-ATP est corrélé à l'ouverture du canal ? Est-ce que ce mécanisme d'activation est celui provoqué par l'ATP ?



Dans un premier temps, nous avons démontré la véracité du mécanisme d'ouverture du canal identifié *in silico*. Pour cela nous avons testé si le zinc était capable d'activer le récepteur par lui-même en absence d'ATP. Le zinc n'est pas capable d'activer les récepteurs rP2X2 sauvages (rP2X2 WT). L'introduction de la mutation T339S, connue pour augmenter la probabilité d'ouverture du canal sans affecter le site de fixation de l'ATP, fut utilisée pour diminuer l'énergie nécessaire à l'activation du récepteur. Ainsi, le zinc active de lui-même les récepteurs rP2X2/T339S, montrant que la fermeture du site de fixation de l'ATP nécessaire à la chélation du zinc induit l'ouverture du canal (Fig. 32a). Le zinc active avec la même efficacité le double mutant K69A/T339S (Fig. 32b). Le K69A étant connu pour abolir la fixation de l'ATP, nous pouvons exclure que l'activation des récepteurs, par le zinc, serait en réalité due à des traces d'ATP.

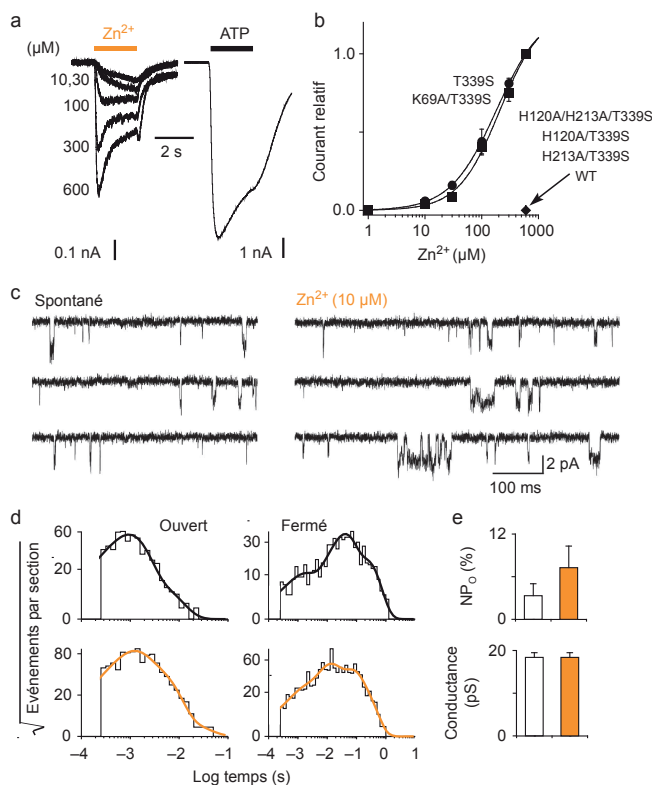


Figure 32. Activation par le zinc du mutant rP2X2 T339S au travers des résidus H120 et H213. (a) Courants provoqués par le zinc (aux concentrations indiquées) et par l'ATP (30 µM). Les enregistrements sont effectués sur la même cellule exprimant le mutant T339S. (b) Courbes dose-réponse du zinc pour les mutants T339S et K69A/T339S (Pour T339S: $CE_{50} = 221 \pm 47 \mu\text{M}$, $n_H = 1,2 \pm 0,2$, $N = 5$; pour K69A/T339S: $CE_{50} = 273 \pm 89 \mu\text{M}$, $n_H = 1,2 \pm 0,1$, $N = 5$). Pas de réponse enregistrées pour les cellules exprimant rP2X2 sauvage et pour les mutants H120A/H213A/T339S, H120A/T339S et H213A/T339S. (c) Courants en canal unique, d'un patch en configuration outside-out, excisé d'une cellule HEK exprimant le mutant T339S, montrant une augmentation de l'activité spontanée du canal en présence de zinc. (d) Répartition des temps d'ouverture et de fermeture du canal ($N = 7$), en absence (en haut) et en présence de zinc (en bas). (e) Histogramme (basé sur les résultats de d) montrant une augmentation de NPo sans modification de la conductance unitaire du canal activé par le zinc (barre orange). Les données représentent la moyenne \pm SEM.

Pour explorer les mouvements dynamiques du site de fixation de l'ATP, nous avons déplacé le site zinc sur une autre portion mobile du site de fixation de l'ATP. La chélation du zinc par les résidus S116H et T170H, nécessitant le rapprochement des boucles A et B, et donc la fermeture du site de fixation de l'ATP, provoque une ouverture du canal sur le mutant S116H/T170H/T339S* (* fond H120A/H213A, Fig. 33a-e). Des expériences en canal unique permirent de montrer que le zinc active les récepteurs T339S (site zinc natif, H120/H213) et S116H/T170H/T339S* en augmentant la fréquence d'ouverture du canal, sans affecter la conductance unitaire du canal (Fig. 32c-e et Fig.33f-h). La potentialisation par le zinc des courants provoqués par l'ATP est effective sur les récepteurs possédant le site zinc natif H120/H213 et le site zinc artificiel S116H/T170H, suggérant que c'est la contrainte géométrique de fermeture du site qui potentialise l'ouverture du canal induite par l'ATP.

Pour démontrer que l'ATP partage le même mécanisme d'activation que le zinc, nous avons testé la capacité de l'ATP à potentialiser les courants provoqués par le zinc au travers d'un mécanisme allostérique. Des expériences de coexpression des mutants K69A/T339S et H213A/T339S permirent de dissocier physiquement le site de liaison du zinc, du site de fixation de l'ATP. En d'autres termes, le site capable de lier l'ATP ne possède plus de site zinc et le site capable de lier le zinc est associé avec un site incapable de lier l'ATP (Fig. 34). Dans ces expériences l'ATP (0,1 μ M) fut capable de potentialiser les courants zinc. Démontrant que l'ATP potentialise les courants zinc de manière allostérique et suggérant que la fixation de l'ATP favorise la fermeture du site de liaison de l'ATP. Dans une autre série d'expériences, nous avons montré que le TNP-ATP, un antagoniste compétitif des récepteurs P2X, inhibe l'activation du récepteur par le zinc qui provoque habituellement la fermeture du site (Fig. 35). Suggérant que le TNP-ATP antagonise les courants zinc en empêchant la fermeture du site de liaison de l'ATP.

Cette étude révéla le mécanisme d'activation des récepteurs P2X induit par la fixation d'un agoniste. La fixation d'un agoniste au niveau du site de liaison de l'ATP provoque un mouvement de fermeture du site qui provoque l'ouverture du canal (Fig. 36).

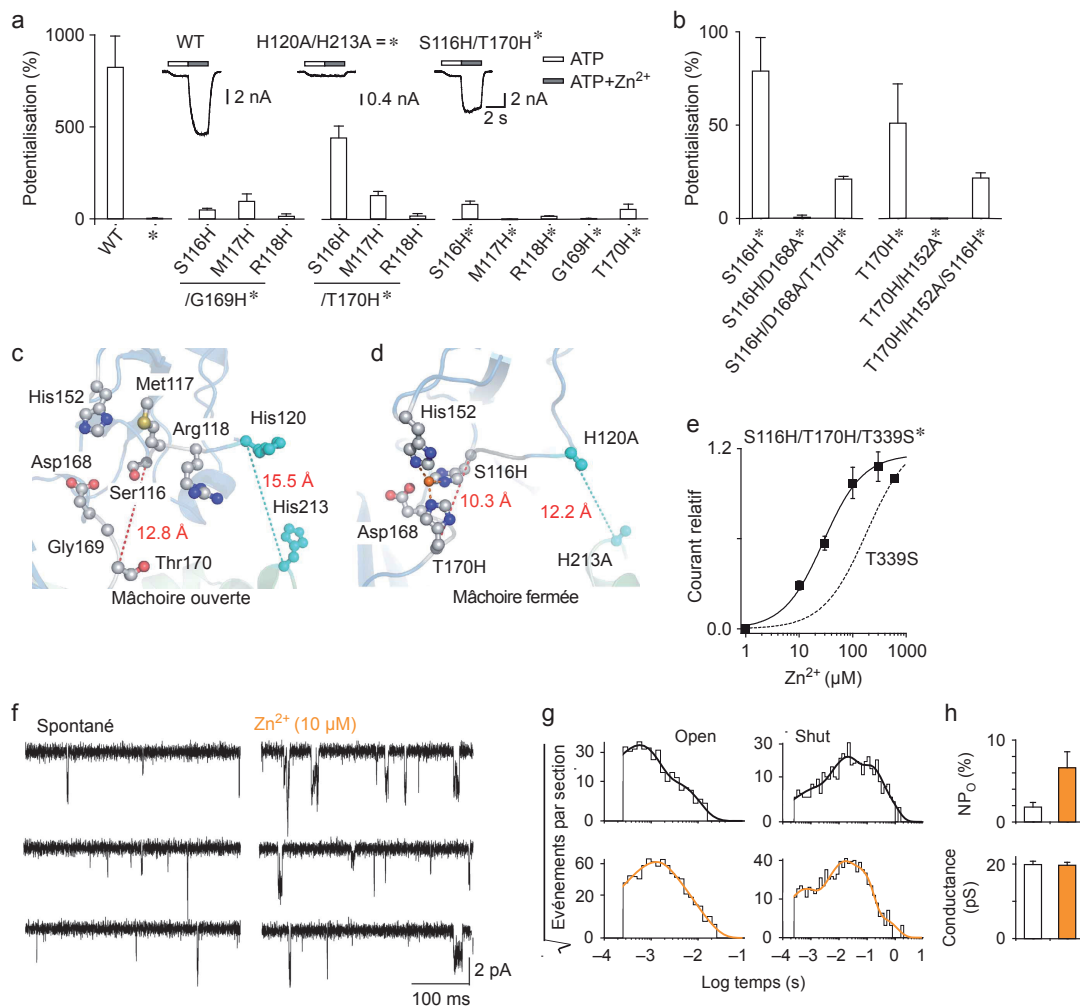


Figure 33. Ingénierie d'un nouveau site de chélation du zinc confortant le modèle de fermeture du site ATP. (a) Histogramme montrant la potentialisation des courants ATP (CE₁₀) par le zinc (20 μM) sur des cellules exprimant les mutants indiqués (N = 4-7). Le fond génétique H120A/H213A est indiqué par *. (Encart) Traces indiquant le protocole utilisé pour réaliser l'histogramme. (b) Histogramme montrant la contribution, des résidus endogènes Asp168 et His152, à la potentialisation du site zinc artificiel, mutant S116H/T170H*. (c) Cartographie, sur le modèle «mâchoire ouverte» de rP2X2 sauvage, des résidus localisés sur les boucles A et B, impliqués dans la coordination du zinc. (d) Modèle «mâchoire fermée» du mutant S116H/T170H* obtenu par exploration du mode 10 permettant de reconstituer le site zinc artificiel. Les distances et les angles mesurés entre le Zn²⁺ (sphère orange) et les atomes de coordination NE2 des histidines sont de 2,3, 2,2, 2,3 Å et 95°, 137° et 128°. Notons que la distance mesurée entre le Zn²⁺ et un oxygène du carboxylate du résidu Asp168 est de 3,9 Å. (e) Courbes dose réponse du Zn²⁺ des mutants S116H/T170H/T339S* et T339S (Pour S116H/T170H/T339S*: CE₅₀ = 27 μM ± 3 μM, n_H = 1,2 ± 0,1, N = 6; pour T339S (courbe en pointillée): CE₅₀ = 221 ± 47 μM, n_H = 1,2 ± 0,2, N = 5). (f) Courants en canal unique, d'un patch en configuration outside-out, excisé d'une cellule HEK exprimant le mutant S116H/T170H/T339S*, montrant une augmentation de l'activité spontanée du canal en présence de zinc. (g) Répartition des temps d'ouverture et de fermeture du canal (N = 6), en absence (en haut) et en présence de zinc (en bas). (h) Histogramme (basé sur les résultats de g) montrant une augmentation de NP_o sans modification de la conductance unitaire du canal activé par le zinc (barre orange). Les données représentent la moyenne ± SEM.

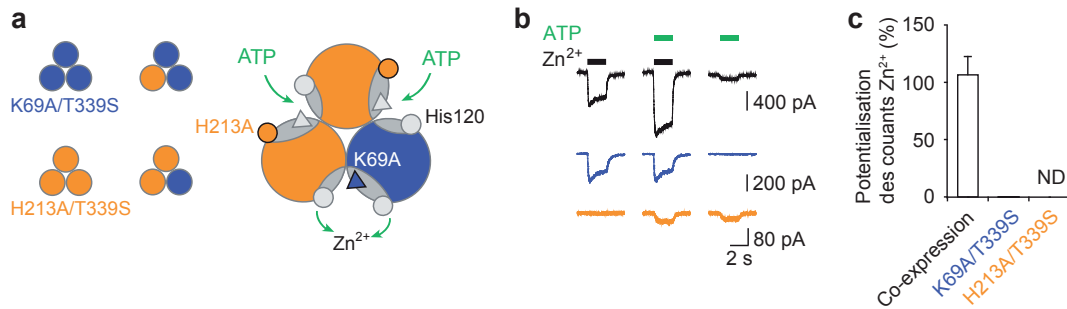


Figure 34. La fixation de l'ATP favorise la fermeture de la mâchoire. (a) Schéma de l'expression des hétéromères issus de la co-transfection des mutants K69A/T339S et H213A/T339S. (b) Traces représentatives de la potentialisation des courants zinc (200 μM) par l'ATP (0,1μM) sur des cellules exprimant l'hétéromère (traces noires), l'homomère K69A/T339S (traces bleues) ou l'homomère H213A/T339S (traces orange). (c) Résumé des données pour chaque construction montrée en b (N = 4-7). La potentialisation est définie par le ratio des courants en présence d'ATP et de zinc et des courants en présence uniquement de zinc. ND, non déterminé, car aucun courant entrant évoqué par le zinc n'a été mesuré sur le mutant H213A/T339S.

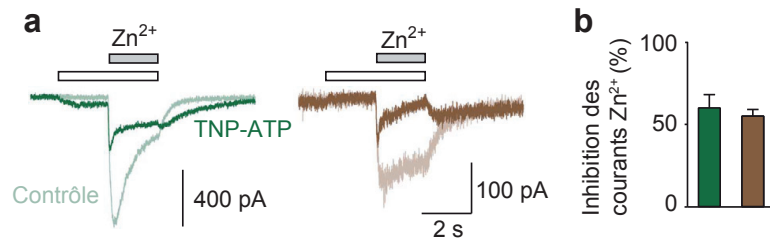


Figure 35. L'antagoniste compétitif, TNP-ATP, inhibe les courants Zn²⁺ des récepteurs contenant le site Zn²⁺ natif ou artificiel. (a) Enregistrement électrophysiologique, en mode cellule entière, des courants provoqués par le Zn²⁺ (200 μM) en absence (traces claires) ou en présence (traces foncées) de TNP-ATP (10 μM). Les cellules expriment (traces vertes) le mutant T339S ou (traces marron) le mutant S116H/T170H/T339S*. (b) Histogramme des pourcentages d'inhibition des courants Zn²⁺ par le TNP-ATP pour les constructions T339S ou S116H/T170H/T339S* (N = 5-8).

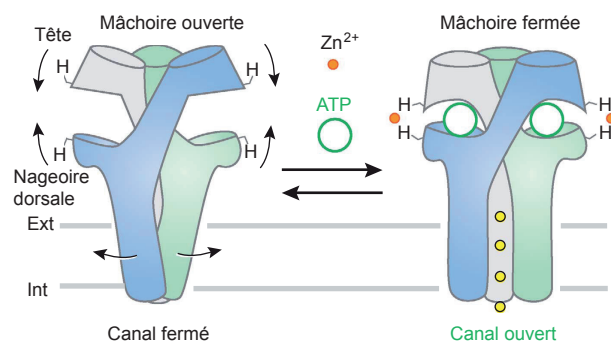


Figure 36. Représentation schématique d'un mécanisme plausible d'activation des récepteurs P2X. La fixation d'un agoniste à l'interface des sous-unités refermerait la mâchoire formant le site de liaison de l'ATP, provoquant un mouvement directement couplé à l'ouverture du canal. Le Zn²⁺ stabiliserait la fermeture de la mâchoire, par l'intermédiaire d'une paire d'histidines localisées de part et d'autre du site ATP.

Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels

Ruotian Jiang¹, Antoine Taly¹,
Damien Lemoine, Adeline Martz,
Olivier Cunrath and Thomas Grutter*

Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Université de Strasbourg, Illkirch, France

The opening of ligand-gated ion channels in response to agonist binding is a fundamental process in biology. In ATP-gated P2X receptors, little is known about the molecular events that couple ATP binding to channel opening. In this paper, we identify structural changes of the ATP site accompanying the P2X₂ receptor activation by engineering extracellular zinc bridges at putative mobile regions as revealed by normal mode analysis. We provide evidence that tightening of the ATP sites shaped like open 'jaws' induces opening of the P2X ion channel. We show that ATP binding favours jaw tightening, whereas binding of a competitive antagonist prevents gating induced by this movement. Our data reveal the inherent dynamic of the binding jaw, and provide new structural insights into the mechanism of P2X receptor activation.

The EMBO Journal advance online publication, 30 March 2012; doi:10.1038/emboj.2012.75

Subject Categories: membranes & transport; structural biology

Keywords: allosteric mechanism; ligand-gated ion channels; normal mode analysis; purinergic receptors zinc-binding sites

*Corresponding author. Faculté de Pharmacie, Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France. Tel.: þ 333 68 85 41 57; Fax: þ 333 68 85 43 06; E-mail: grutter@unistra.fr

¹These authors contributed equally to this work

Received: 20 December 2011; accepted: 6 March 2012

Discussions et perspectives.

Les expériences de NMA permettent de révéler des mouvements moléculaires théoriques mais avec un certain nombre d'approximations qui peuvent modifier la position précise des atomes. Dans cette étude, les NMA n'ont pas détectés d'ouverture significative du canal. Ceci pourrait s'expliquer par une surestimation, inhérente au champ de force utilisé, de l'énergie d'interaction entre les hélices- α TM2 au niveau de la porte du canal (gate), résultant en une barrière énergétique bloquant le canal dans une forme fermée. Cependant nous savons que le zinc tout seul n'ouvre pas le canal du récepteur rP2X2 WT, suggérant, pour le type sauvage, que la fermeture du site ATP, par chélation du zinc par H120 et H213, n'apporte pas suffisamment d'énergie pour ouvrir le canal. L'apport d'énergie dans les modes de NMA par l'incorporation de l'ATP n'a pas non plus permis d'obtenir une ouverture significative du canal. Une explication plausible est que la position de l'ATP, extraite du docking de l'ATP basé sur nos récentes données de marquage d'affinité, ne représente pas la position capable d'activer le récepteur. En effet, le seul point de contact entre le C8 de l'adénine et le récepteur ne suffit pas pour prédire la position de l'ATP qui provoque l'ouverture du canal. Une façon pour provoquer une ouverture serait d'introduire la mutation T339S dans le modèle de rP2X2 utilisé en NMA. Cette mutation entraînant une ouverture spontanée du canal, pourrait diminuer la barrière énergétique d'ouverture du canal et augmenter significativement sa fréquence d'ouverture en corrélation avec la fermeture du site ATP.

C'est ce que nous avons fait expérimentalement. Le mutant T339S est activé par le zinc, révélant de manière forte que l'ouverture du canal est corrélée avec la fermeture du site ATP. Nous avons apporté l'évidence que la fixation de l'ATP favorise l'activation de P2X par le zinc de manière allostérique, en provoquant le rapprochement des résidus H120 et H213 autour du métal. Cependant, étant donné la proximité spatiale des sites de liaison du zinc et de l'ATP, cette étude ne nous permet pas d'exclure la part d'une possible interaction directe entre le zinc et une partie de l'ATP dans la potentialisation de la réponse ATP sur rP2X2 WT. Bien que le zinc soit capable d'activer les récepteurs rP2X2/T339S de lui même, son efficacité reste faible.

La réponse maximale provoquée par le zinc représente 4% de la réponse maximale induite par l'ATP, suggérant que la chélation du zinc par H120 et H213 produit une fermeture incomplète du site ATP. La récente structure cristallographique de zfP2X4, résolue dans un état ouvert en présence d'ATP (Hattori & Gouaux 2012), permet de confirmer nos résultats. Montrant que l'ATP provoque le rapprochement de la tête et de la nageoire dorsale de deux sous-unités adjacentes en provoquant une constriction du site ne se limitant pas au rapprochement des histidines H120 et H213.

Nous avons anticipé les données apportées par la cristallographie, avec certes moins de détail, mais en utilisant des stratégies alternatives de modélisation moléculaire et d'ingénierie de site zinc. Ainsi nous avons révélé de manière originale le mécanisme d'activation des récepteurs P2X.

Nous avons aussi utilisé le canal activé par le zinc pour démontrer que l'état intermédiaire piégé par le NCS-ATP sur L186C favorise le mouvement de fermeture du site, appuyant fortement l'hypothèse d'un état partiellement ligandé précédant un état actif complètement ligandé (Jiang et al 2012b).

Les données apportées par le marquage d'affinité et l'ingénierie de site zinc associées à la modélisation moléculaire vont nous permettre d'orienter la stratégie d'élaboration d'un PTL analogue de l'ATP.

7. Outils optogénétiques pour la photorégulation de l'activité des récepteurs P2X.

7.1. Vers un dérivé d'ATP photoisomérisable.

7.1.1. Contexte.

Au commencement de ce projet, la stratégie du PTL avait fait ses preuves sur les canaux potassiques voltage dépendants et les récepteurs ionotropiques du glutamate, donnant naissance au canaux activés par la lumière SPARK et LiGluR6. A ce jour, cette stratégie n'a jamais été appliquée aux récepteurs P2X. Un récepteur P2X pourrait constituer un outil prometteur pour l'investigation des voies de signalisations impliquant les récepteurs P2X. Concernant ces récepteurs, la structure de l'état actif en présence d'ATP n'existait pas encore. Nous disposions uniquement de la structure dans un état fermé, de nos données sur le marquage d'affinité et de la démonstration du mécanisme d'activation des récepteurs P2X.

7.1.2. Stratégie.

La stratégie adoptée pour photoréguler l'activité des récepteurs canaux P2X est celle des PTL. Cette stratégie dont le principe est simple et qui a fait ses preuves sur de nombreuses cibles est amplement détaillée dans le chapitre 1.2.1.2. Brièvement, cette stratégie consiste à lier covalamment un ligand à son récepteur par l'intermédiaire d'un bras espaceur capable de s'isomériser, en fonction de la lumière, entre un isomère *trans* étendu et un isomère *cis* plié. Ceci permet de contrôler la position du ligand par rapport à son site de liaison et de forcer le ligand à rester éloigné du site ou d'imposer la liaison du ligand à son site. Un tel outil permet de réguler par la lumière l'activité d'un récepteur canal.

La stratégie PTL appliquée aux récepteurs P2X consiste en la synthèse d'un analogue de l'ATP, le maléimide-azobenzène-ATP et en la mutation du récepteur pour permettre la liaison covalente de la molécule photoisomérisable au récepteur.

La première étape est de trouver le point d'ancrage du bras photoisomérisable, maléimide-azobenzène sur l'ATP. Le but est de fixer un groupement de taille conséquente, de l'ordre de la vingtaine d'angströms, sur l'ATP sans modifier dramatiquement son caractère agoniste.

La deuxième étape consiste à mener des expériences de docking pour identifier les résidus à muter en cystéine et de les muter par mutagenèse dirigée.

La dernière étape est de procéder à la campagne de marquage et d'obtenir un « light-gated P2X receptor » (LiP2XR).

7.1.3. Matériel et méthodes.

Expériences de bioinformatiques (docking) :

Les expériences de docking se sont faites en prenant en compte les données de marquage d'affinité et d'ingénierie de site zinc. La position de l'atome de carbone C8 de l'adénine fut imposée à proximité du résidu L186 (notation rP2X2). Nous avons utilisé un modèle par homologie de rP2X2 généré par le Dr. Antoine Taly, à partir de la structure cristallographique de zfP2X4 (code PDB : 3H9V), dans lequel la fermeture des trois sites-ATP est stabilisée par la chélation d'un atome de zinc par les histidines H120 et H213 (Jiang et al 2012a).

Préparations des molécules :

La structure des molécules fut construite à partir du logiciel ChemDraw3D. L'angle dièdre entre les cycles aromatiques de l'azobenzène fut imposé à 0° pour obtenir l'isomère *cis* et à 180° pour obtenir l'isomère *trans*, puis les molécules subirent une minimisation d'énergie. Les ligands furent ensuite préparés au docking avec autodock tools, c.-à-d. que pour chaque molécule fut déterminé les charges, les liaisons de libre rotation et le type d'atome constituant la molécule (A, carbone aromatique ; C, carbone ; NA, azote accepteur de liaison hydrogène ; OA, oxygène accepteur de liaison hydrogène ; N, azote ; P, phosphore ; HD, hydrogène donneur de liaison hydrogène). Ensuite, dans les fichiers texte des molécules fut modifié le type

d'atome du C8 de l'adénine de C en Z. Cette modification est nécessaire pour imposer la localisation de l'atome C8 dans le site de liaison de l'ATP.

Préparation de l'espace de docking sur le récepteur:

A l'aide du logiciel AutoDockTools, l'espace de réalisation du docking fut restreint au site de fixation de l'ATP dans un volume en trois dimensions appelé boîte (Fig. 37).

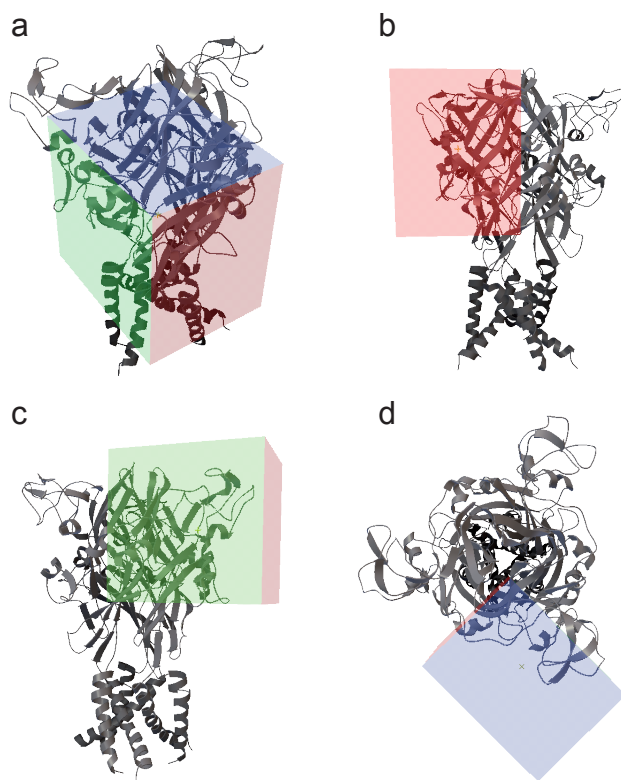


Figure 37. Représentation de l'espace de docking. (a) Vue globale de la boîte englobant le site ATP, positionnée sur un modèle de rP2X2 représenté en cartoon. En couleur, les surfaces de la boîte parallèles à l'axe des x (rouge), y (vert) et z (bleu). (b) Vue de côté dans un plan parallèle à l'axe des x. (c) Vue latérale dans un plan parallèle à l'axe des y. (d) Vue extracellulaire sur le dessus dans un plan parallèle à l'axe des z.

Les paramètres, de la boîte, qui furent utilisés sont les suivants :

Taille en points	Coordonnées du centre
x = 114	x = 26,341
y = 86	y = -19,326
z = 112	z = 59,755

Ensuite avec AutoGrid4, furent calculés les cartes d'interactions entre les différents types d'atome constituant les molécules et les atomes du récepteur, dans l'espace de la boîte. Dans les paramètres de calcul des cartes d'interactions, la position de l'atome Z (C8 de l'adénine) des ligands fut imposée à proximité du résidu L186 en lui appliquant une fonction d'énergie

empirique (covalent map), qui est un puits énergétique défini par son diamètre (d) exprimée en angström, sa profondeur exprimée en valeur énergétique (E) et ses coordonnées dans l'espace x, y, z (Fig. 38). Les paramètres de contrainte de position furent définis de manière itérative de manière à limiter le déplacement du C8 à une sphère d'environ 4-5 Å de diamètre. La contrainte ne doit pas être trop forte, au risque de figer le C8 dans l'espace et ne doit pas non plus être trop faible, ce qui permettrait au C8 d'explorer une trop grande surface.

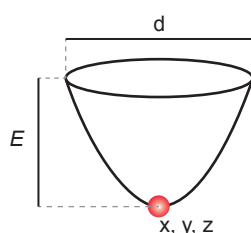


Figure 38. Représentation de la fonction d'énergie

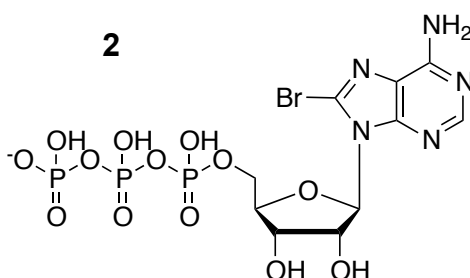
Expériences de docking :

Les expériences de docking furent générées, avec AutoDock4, pour les isomères *cis* et *trans* des trois ligands. AutoDock4 score les interactions ligand-récepteurs à partir des cartes d'interactions précédemment générées par AutoGrid4. Le docking génère ainsi des groupes de conformations proches, plus ou moins peuplés, appelés « clusters ». Tous les clusters dont l'effectif est inférieur à cinq furent rejetés. Ensuite pour chaque cluster une conformation représentante fut extraite (celle de plus basse énergie). Les résultats de docking furent analysés avec PyMOL.

Pour cette molécule, tous les résidus à proximité du maléimide (5 Å) sont identifiés pour les isomères *cis* et *trans*. Le but étant d'obtenir un PTL ATP qui active le récepteur en *cis*, tous les résidus identifiés pour l'isomère *trans* présents dans la liste des résidus identifiés pour l'isomère *cis* furent exclus. Une liste de 25 résidus à muter en cystéine est ainsi établie.

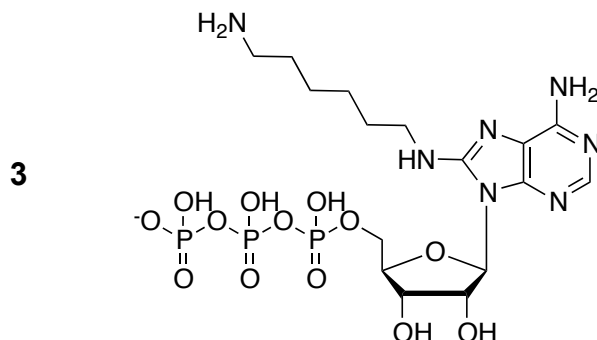
Synthèse organique :

Tous les produits chimiques de qualité analytique proviennent de chez Sigma-Aldrich ou Alfa Aesar. Les analyses en RMN ^1H et ^{13}C sont faites à 400 MHz et les analyses ^{31}P à 500 MHz. Les constantes de couplage (J) sont exprimées en Hz et les déplacements chimiques (δ) sont donnés en partie par million (ppm) en utilisant le pic de solvant résiduel comme référence relative au TMS, s = singulet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, m = multiplet. Des colonnes Beta-Basic C 18 de Thermo Scientific (4,6 \times 250 mm) et (10 \times 250 mm) ont été utilisées en HPLC analytique et en purification HPLC semi-préparative, respectivement. Du Bio-Gel P-2 (200 - 400 mesh) de chez *BIO-RAD* a été utilisé pour les purifications en chromatographie d'exclusion. Des résines Dowex 50WX8 (forme acide, 200 - 400 mesh) et 1X8 (forme chlorure, 200 - 400 mesh) de chez Sigma Aldrich ont été utilisées pour les purifications en chromatographie d'affinité.



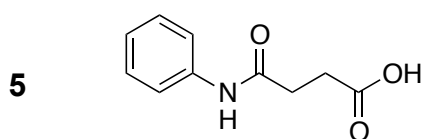
8-Br-ATP, 8-bromoadénosine-5'-triphosphates :

De l'ATP (5 g, 0,72 mmol) est dissout dans du tampon acétate de sodium 1 M, pH 4 (100 ml), puis du dibrome liquide (1,5 mL) est ajouté. Le mélange est agité vigoureusement pendant 4 h à température ambiante. L'excès de dibrome est neutralisé par ajout, goutte à goutte, d'ammoniac concentré jusqu'à ce que la solution passe du brun au rouge. Le Br-ATP est précipité avec un mélange éthanol/acétone (1 : 1, vol/vol). Un solide brun-jaune est récupéré par filtration (80%). RMN ^1H (400 MHz, D_2O): δ = 8,15 ppm (s, 1H), 6,05 (d, J = 5.4 Hz, 1H), 5,24 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 4,55-4,52 (m, 1H), 4,22-4,19 (m, 1H), 4,13-4,01 (m, 2H). (Wright & Miller 2006)



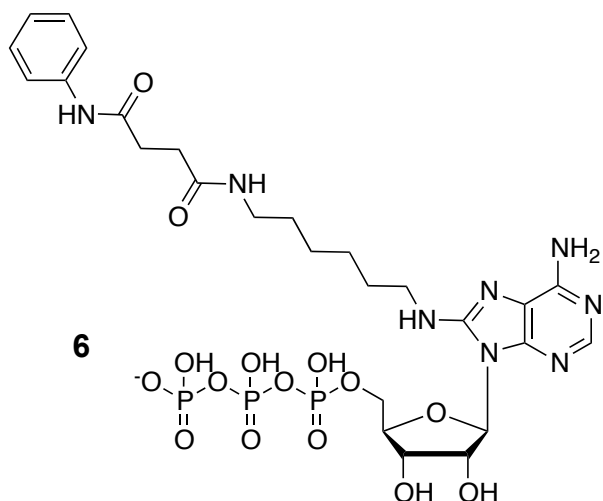
8-[(Aminohexyl)-amino]-ATP :

Du 8-Br-ATP (200 mg, 0,32 mmol) et du diaminohexane (368 mg, 3,2 mmol) sont solubilisés dans de l'eau (6 mL) à 60°C pendant 5 h. Le milieu réactionnel est purifié avec une colonne échangeuse d'anion, Dowex 1-X8 (actétate). Le produit est élué avec une solution de LiCl 1 mM HCl (500 mL à 0,125 et 0,5 M de LiCl dans 1 mM de HCl). Les fractions contenant le 8-[(Aminohexyl)-amino]-ATP sont rassemblées et concentrées *in vacuo*. Le brut est déposé sur une colonne biogel P2 (200-400 mesh) pour enlever l'excès de sel et de 1,6-diaminohexyle. Les fractions contenant le nucléotide sont rassemblées et évaporées à sec *in vacuo*, pour donner un solide blanc contaminé avec 0,5 éq. de 1,6-diaminohexyle (78%, rendement calculé en utilisant l'UV ; $\epsilon = 17000$ à 279 nm pour le 8-[(Aminohexyl)-amino]-ATP) (Hampton et al 1982). RMN ^1H (400 MHz, D_2O) : $\delta = 8,14$ (s, 1H), 6,08 (m, 1H), 4,43 (m, 5H), 3,50 (m, 2H), 3,17 (m, 2H), 1,80 (m, 4H), 1,52 (m, 4H). (Maurizi & Ginsburg 1986)



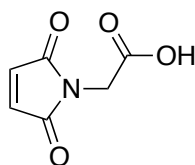
AS, Acide 4-oxo-4-(phénylamino)butanoïque :

A une solution d'anhydride succinique (5 g, 50 mmol) dans de l'éther diéthylique (50 mL) est ajouté de l'aniline goutte à goutte (4,8 mL, 50 mmol). Le milieu réactionnel est agité vigoureusement pendant 2 h. Un précipité blanc est obtenu, filtré et lavé avec de l'éther diéthylique à 0°C. Le produit désiré est obtenu sous forme d'une poudre blanche (83%). RMN ^1H (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : $\delta = 7,57$ ppm (m, 2H), 7,27 ppm (m, 2H), 7,01 ppm (m, 1H), 2,54 ppm (m, 4H). RMN ^{13}C (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) : 173,78, 170,02, 139,28, 128,63, 122,87, 118,87, 31,02, 28,78. (Pshezhetsky & Nifant'ev 2005)



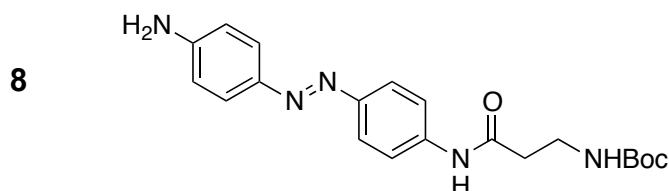
8-AS-DH-ATP, 8-[*N*¹-(6-aminohexyl)-*N*⁴-phénylsuccinamido]-ATP :

L'acide 4-oxo-4-(phénylamino)butanoïque (77 mg, 398 μmol) est dissout dans de la DMF anhydre (2 mL) avec de la tributylamine (155 μL , 648 μmol) et de l'isobutyl chloroformate (62 μL , 472 μmol) ajouté goutte à goutte. Le mélange est laissé dans la glace 1 h, puis le sel de lithium du 8-[(Amino-hexyl)-amino]-ATP en solution aqueuse (4 mL, 249 μmol) est ajouté goutte à goutte. Ensuite, le milieu réactionnel est laissé à température ambiante 2 h, puis évaporé à sec *in vacuo*. Le brut solubilisé dans l'eau (50 mL) est lavé avec du CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). La phase aqueuse concentrée *in vacuo* est ensuite purifiée par HPLC en phase inverse C^{18} avec une colonne semi-préparative (éluants : eau TFA 0,1%, acétonitrile), en utilisant le protocole suivant (exprimé en pourcentage d'acétonitrile) : sur 3 min de 0-10%, 10% pendant 12 min, sur 3 min 10-15%, 15% pendant 7 min (débit 4 mL/min). Le solide blanc désiré est obtenu, son temps de rétention est de 23,2 min (2,5%). En raison de la faible quantité de produit obtenu, la RMN ^1H (400 MHz, D_2O) ne nous permet pas de visualiser les signaux des CH 2', 3' et 4', en revanche les signaux caractéristiques suivants sont analysables: $\delta = 8,46$ (s, 1H), 7,65 (m, 2H), 7,53 (m, 2H), 7,31 (m, 2H), 6,25 (d, $J = 6,9$ Hz, 2H), 3,47 (m, 4H), 3,32 (m, 2H), 2,83 (m, 2H), 2,70 (m, 2H), 1,76 (m, 2H), 1,64 (m, 2H), 1,47 (m, 2H). Les trois phosphates sont présents RMN ^{31}P (500 MHz, D_2O) : $\delta = -10,58$, $-11,58$, $-25,62$. La masse correspond au produit désiré, SM (MALDI-TOF), (m/z), (M-H)⁻ calculé pour $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_8\text{O}_{15}\text{P}_3$: 795,17. Trouvé : 795,15. (Webb & Corrie 2001)



N-maléoylglycine, acide 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acétique :

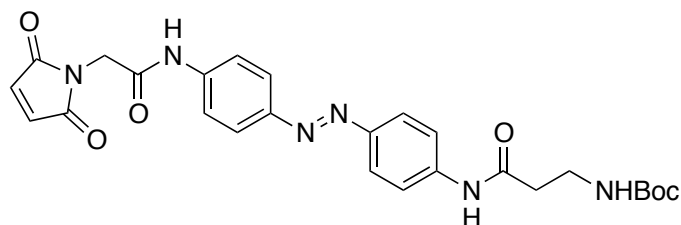
De l'anhydride maléique (19,6 g, 0,2 mol) et de la glycine (15,1 g, 0,2 mol) sont mis en suspension dans un mélange anhydre acétonitrile/acétate d'éthyle (1 : 1, vol/vol) (80 mL). La mixture est agitée vigoureusement pendant 24 h. L'avancement de la réaction est suivi par RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆). Le milieu réactionnel est évaporé à sec *in vacuo*. Le solide blanc obtenu est remis en suspension dans un mélange anhydre de toluène (150 mL), d'acide acétique (20 mL) et de TFA (4 mL) puis mis à reflux à 120°C, dans un montage de Dean Stark, pendant 48 h, sous atmosphère inerte. Le brut concentré *in vacuo* est purifié par chromatographie sur silice (CH₂Cl₂ à CH₂Cl₂/MeOH 5%), donnant le produit désiré sous forme d'une poudre blanche hygroscopique (63%). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 7,12 ppm (s, 2H), 4,14 ppm (s, 2H).



AZB-βala-Boc (E)-tert-butyl(3-((4-((4-aminophényl)diazényl)phényl)amino)-3-oxopropyl)carbamate :

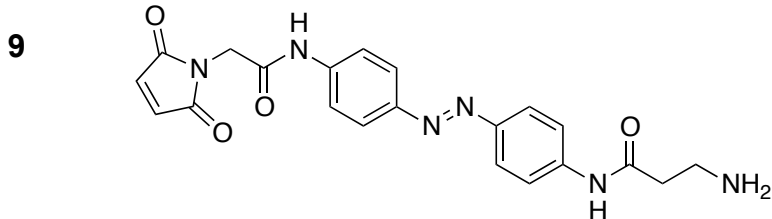
L'acide Boc-βAla-OH (1,2 g, 6,5 mmol), HOBt (1,14 g, 8,7 mmol), DIPEA (3,97 mL, 22,9 mmol) et EDCI (1,43 g, 7,6 mmol) sont solubilisés dans CH₂Cl₂ (30 mL) et agités sous atmosphère inerte à 0°C pendant 1 h. Ce mélange est ensuite ajouté goutte à goutte à une solution d'azodianiline (1,16 g, 5,4 mmol) et DIPEA (1,8 mL, 10,9 mmol) dans CH₂Cl₂ (150 mL). La mixture est agitée pendant 12 h à température ambiante. Le mélange est dilué avec CH₂Cl₂ (200 mL) et lavé avec une solution saturée de NaHCO₃ (3 × 200 mL). La phase organique est séchée avec Na₂SO₄²⁻, puis filtrée et concentrée *in vacuo*. Le brut est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH₂Cl₂/EtOAc, de 10:0 à 7:3), donnant le solide orange désiré (57%). RMN ¹H (400 MHz, MeOH-

d_6) : δ = 7,76 (d, J = 9 Hz, 2H), 7,69 (m, 4H), 6,73 (d, J = 9 Hz, 2H), 3,41 (t, 2H), 2,58 (t, 2H), 1,43 (s, 9H). SMHR (ESI) (m/z), ($M+H$)⁺ calculé pour C₂₀H₂₅N₅O₃ : 384,20302. Trouvé : 384,20142. (Volgraf et al 2006)



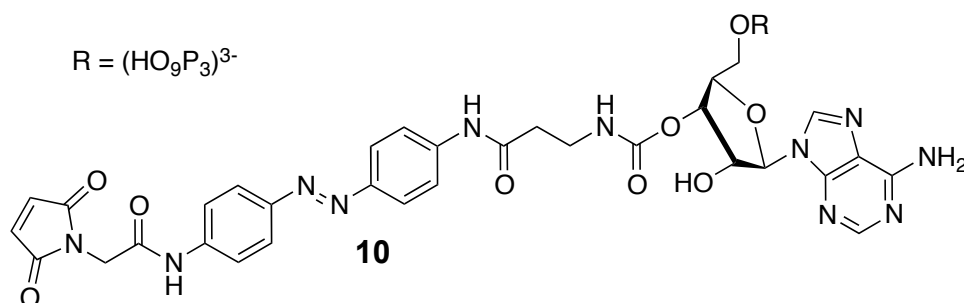
MAC-Boc, (E)-tert-butyl(3-((4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-3-oxopropyl)carbamate :

A une solution de N-maléoylglycine (1,2 g, 7,83 mmol) et de chlorure d'oxalyte (676 μ L, 7,91 mmol) dans CH₂Cl₂ (10 mL), sont ajoutés trois gouttes de DMF. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, sont ajoutés goutte à goutte, la DIPEA (884 μ L, 7,93 mmol) et une solution d'AZB- β ala-Boc (600 mg, 1,57 mmol), de DIPEA (272 μ L, 1,57 mmol) et de DMAP (~1 mg) dans du THF (10 mL). Après agitation à 0°C pendant 10 min, le mélange est laissé sous agitation pendant 3 h à température ambiante. Le brut est concentré in vacuo (dépôt solide sur célite) et purifié par chromatographie « flash » en phase inverse C¹⁸ (40 g, éluants : eau/acétonitrile). Le produit désiré, élué à 24% d'acétonitrile, est obtenu sous forme d'une poudre orange (84%). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) : δ = 10,61 (s, 1H), 10,27 (s, 1H), 7,80 (m, 8H), 7,16 (s, 2H), 6,90 (m, 1H), 4,33 (s, 2H), 3,23 (m, 2H), 1,37 (s, 9H). SM (ESI) (m/z), ($M-H$)⁻ calculé pour C₂₆H₂₇N₆O₆ : 519,2. Trouvé : 519,2. (Volgraf et al 2006)



MAC, (E)-3-amino-N-(4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétamido)phényl)diazényl)phényl)propanamide :

A une solution de MAC-Boc (171 mg, 0,33 mmol) dans CH_2Cl_2 (8 mL) est ajouté du TFA (2 mL). La mixture est agitée 1h puis évaporée à sec *in vacuo*. Ce produit déprotégé est tout de suite engagé dans la réaction de couplage à l'ATP. RMN ^1H (400 MHz, Acétone- d_6) : δ = 7,85 (m, 8H), 7,00 (s, 1H), 4,42 (s, 1H), 4,15 (t, 2H), 3,08 (t, 2H). SM (ESI) (m/z), ($M+H$) $^+$ calculé pour $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_6\text{O}_4$: 421,2. Trouvé : 421,2. (Volgraf et al 2006)



2',3'-MAC-ATP :

La synthèse du 2',3'-MAC-ATP fut adaptée de (Webb & Corrie 2001).

30 g de résine (Dowex-50, forme acide) sont mis en suspension dans un mélange eau (400 mL), méthanol (100 mL), tributylamine (70 mL), pour donner une résine-tributylammonium. Le sel d'ATP disodique (1 g, 1,8 mmol) est transformé en sel de tributylammonium par passage lent sur une résine échangeuse de cation (débit 0,2 mL/min). L'éluat est ensuite évaporé à sec *in vacuo*, puis solubilisé dans CH_2Cl_2 (10 mL) et filtré. La quantité désirée d'ATP est prélevée dans ce mélange (0,98 mmol, détermination UV, ϵ = 15400 à 259 nm), évaporée à sec, puis évaporée trois fois en présence de DMF et solubilisé dans du DMF (20 mL) avec de la tributylamine (2,4 mL, 9,84 mmol). A cette solution anhydre d'ATP, est ajouté du carbonyldiimidazole (822 mg, 4,92 mmol), le tout est mis sous agitation une nuit à 5°C sous atmosphère inerte. L'excès

de carbonyldiimidazole est ensuite neutralisé par ajout de méthanol (320 μ L, 7,87 mmol). A ce mélange est ajoutée goutte à goutte, une solution de MAC (171 mg, 0,33 mmol) fraîchement déprotégé, dans du DMF (20 mL) avec de la tributylamine (100 μ L, 1,3 mmol). L'avancement de la réaction est suivi par HPLC analytique en phase inverse (C^{18}) avec un gradient 0-100% acétonitrile sur 30 min. Après 3 h à 5°C, de l'eau est ajoutée (80 mL) pour arrêter la réaction.

Ce couplage entraînerait une modification du phosphate terminal qui peut être enlevée par traitement acide, ainsi qu'une modification de l'adénine qui peut être enlevée par traitement basique. Cependant, nous ne pouvions pas faire de traitement basique, sous peine d'hydrolyser le maléimide. Le carbamate qui serait généré sur l'amine aromatique en position 6 de l'adénine est une espèce instable qui est hydrolysée en milieu aqueux. Le pH de la solution est ajusté à 2,5 avec de l'HCl concentré, le tout est agité pendant 20 h à 5°C. Le traitement acide n'a pas entraîné de changement au niveau du profil HPLC (C^{18} , 0-100% acétonitrile sur 30 min). La solution est ensuite ramenée à pH 6, avec une solution de NaOH saturée, filtrée, concentrée *in vacuo* et purifiée en phase inverse C^{18} par HPLC semi-préparative, (éluants : eau TFA 0,1%, acétonitrile) avec le protocole suivant (exprimé en % d'acétonitrile): sur 3 min 0-18%, 18% pendant 10 min, 18-25% pendant 6 min, 25%-100% sur 5 min, 100% pendant 2 min, puis lavage de la colonne et retour à 0%. Le produit désiré n'a pas été isolé.

7.1.4. Résultats.

7.1.4.1. Choix du point de modification de l'ATP.

Nous avons le choix entre différentes positions de modification de l'ATP pour insérer la chaîne photoisomérisable. Les phosphates sont exclus car leur modification entraîne une perte d'affinité du dérivé ATP, comme en témoigne le dérivé d'ATP cagé appelé NPE-ATP. Le NH₂ en position 6 et le C2 sont écartés car il y a de fortes chances pour que cette partie du cycle de l'adénine soit importante pour sa reconnaissance. En effet, le GTP qui diffère de l'ATP par la présence de groupements carbonyle en 6 et amine en 2, n'active pas les récepteurs P2X (Gever et al 2006). Nous avons donc choisi de commencer par explorer les positions 8 de l'adénine et 2', 3' au niveau du ribose.

Investigation de la position 8.

Sur la base de nos résultats sur le marquage d'affinité nous savions que l'ATP tolère la fixation de groupements sur la position 8 du cycle de l'adénine. Le 8-thiocyano-ATP voit son affinité apparente, ou sa CE₅₀, diminuée d'un facteur 3,5 et son efficacité ou son I_{max} augmentée d'un facteur 1,4 (Fig. 27c). Nous décidions alors de réaliser la synthèse d'un « tether model », dérivé 8 de l'ATP. Cette molécule modèle est composée d'une molécule d'ATP substituée dans sa position 8 par une chaîne moléculaire constituée d'une aniline, mimant un demi-azobenzène, lié par un lien amide à l'acide succinique lui-même lié par une liaison amide au 1,6-diaminohexane. Cette longue chaîne a été choisie pour sa grande flexibilité dans le but de minimiser l'influence de la substitution de la position 8 par un groupement de taille conséquente. Cela dans l'espoir de garder une molécule agoniste, car on sait que la position 8 de l'adénine est proche de la protéine. L'analogue 8 de l'ATP fut nommé AnilineSuccinate-DiAminoHexane-ATP (AS-DAH-ATP).

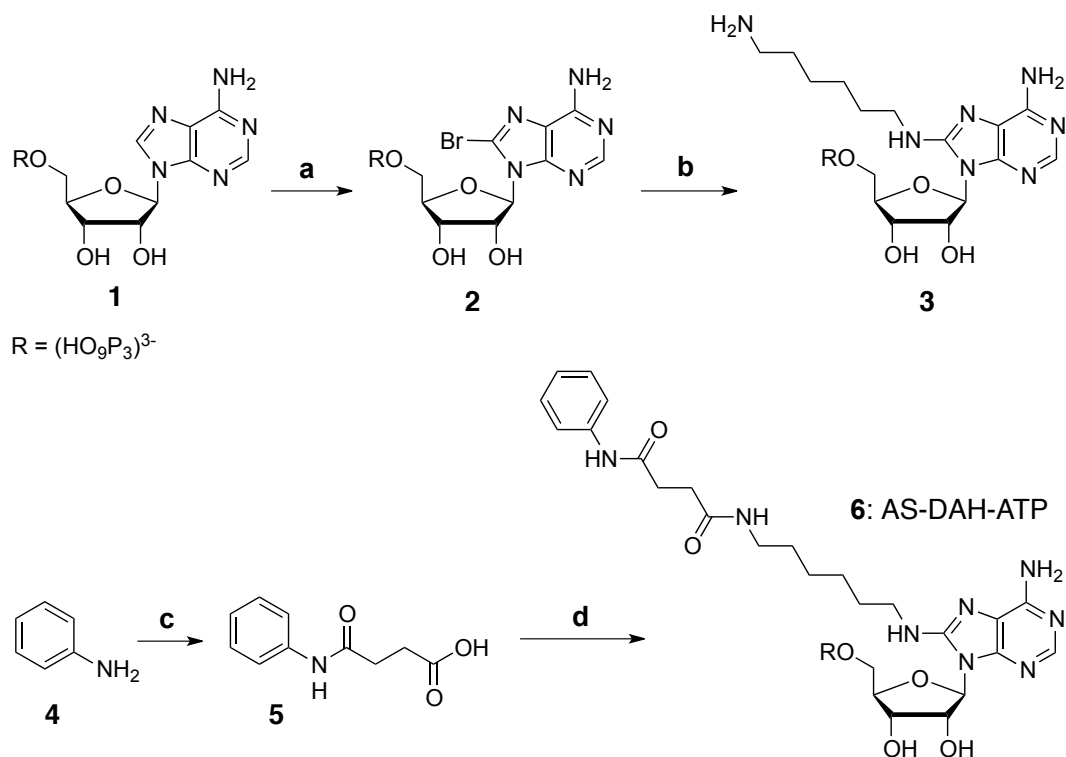


Schéma 2. Synthèse totale de AS-DAH-ATP. Réactifs et conditions : (a) Br_2 , H_2O , pH 4, RT, 4 h ; (b) 1,6-diaminohexane, H_2O , pH 11-12, 60°C , 5 h ; (c) anhydride succinique, éther diéthylique, RT, 2 h ; (d) molécule 3, isobutyl chloroformate, tributylamine, DMF, RT, 3 h.

La synthèse de AS-DAH-ATP est une synthèse convergente consistant en la synthèse du 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP d'une part et en la synthèse de l'anilamidosuccinate (AS) d'autre part. Dans une première étape, le 8-Bromo-ATP fut généré par réaction de substitution nucléophile aromatique de bromure sur la position 8 de l'adénine de l'ATP. Une réaction de substitution nucléophile permet de substituer le brome de la position 8 de l'adénine par le 1,6-diaminohexane et d'obtenir le 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP. Le 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP est difficile à purifier. Après purification par chromatographie d'échange d'ions, puis par chromatographie d'exclusion il resta 50% de 1,6-diaminohexyl. La faible quantité de 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP formée empêchait de faire précipiter le produit à l'acétone-éthanol. Nous décidions tout de même d'engager la réaction finale pour obtenir l'AS-DAH-ATP afin de pouvoir rapidement tester son caractère agoniste sur les récepteurs P2X. AS fut obtenu par réaction d'addition élimination de l'aniline sur l'anhydride succinique. La dernière étape consistait à utiliser un agent de couplage

peptidique compatible avec les phosphates de l'ATP. AS fut activé sous forme d'acyloxyformate d'isobutyle par ajout d'isobutyl chloroformate. Ensuite le 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP fut ajouté à AS activé. Le rendement très faible (2,5%) de cette dernière étape s'expliquerait par la présence de 1,6-diaminohexyl contaminant le 8-[(aminohexyl)-amino]-ATP. La longue chaîne hydrophobe greffée sur l'ATP permet de purifier AS-DAH-ATP en phase inverse (C¹⁸) par HPLC.

Le test par électrophysiologie patch-clamp en mode cellule entière de AS-DAH-ATP (100 µM) révéla que cette molécule n'est pas un agoniste des récepteurs P2X (Fig. 39). La position 8 de l'adénine de l'ATP fut donc abandonnée.

Investigation des positions 2',3'.

J'ai testé en électrophysiologie patch-clamp un dérivé 2',3' de l'ATP fluorescent commercial, l'EDA-ATP-MANT. Cette molécule se révéla être un agoniste des récepteurs P2X (Fig. 39). Pendant sa thèse le Dr Ruotian Jiang montra que le dérivé 2',3'(3)-O-carbamoyl-éthyl-(N)maléimido-ATP (CMA-ATP) est un agoniste entier des récepteurs P2X. Le CMA-ATP initialement utilisé pour le marquage d'affinité des récepteurs P2X n'a pas permis de marquer le site de fixation de l'ATP, suggérant que les hydroxyles 2',3' ne sont pas en contact avec la protéine et explorent le solvant.

Je me suis donc orienté vers la synthèse d'un dérivé 2',3' photoisomérisable de l'ATP, le maléimide-azobenzène-ATP. Trois molécules potentielles ont été envisagées, avec des variations au niveau la chaîne d'espacement entre l'azobenzène et l'ATP (Fig. 40). Je décidais de réaliser des expériences de docking pour révéler le meilleur candidat et en même temps identifier les résidus à muter en cystéine.

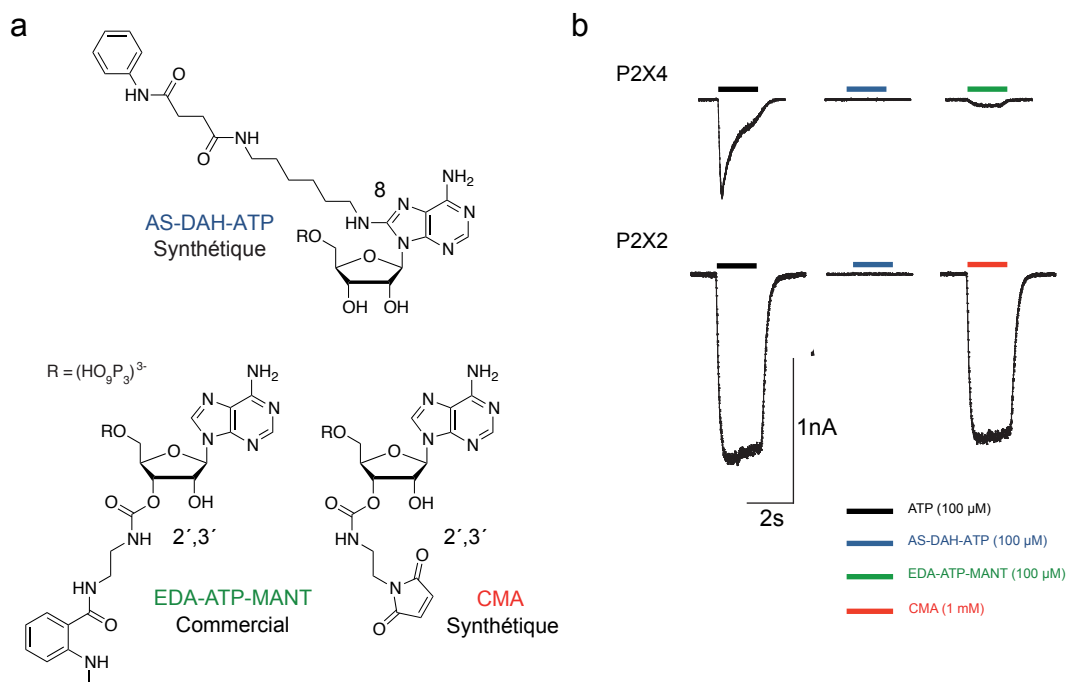


Figure 39. Identification du point d'ancrage de la chaîne photoisomérisable sur l'ATP. (a) Structure des hémiswitches mimant le bras d'espaceur entre l'ATP et l'azobenzène. (b) courants évoqués par les différentes molécules sur P2X2 et P2X4. Concernant P2X2, le AS-DAH-ATP a été testé dans une cellule différente.

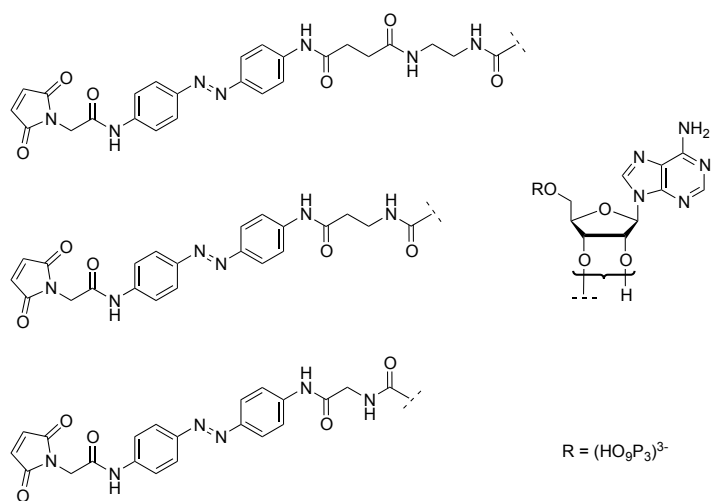


Figure 40. Structure de chaînes latérales photoisomérisables envisagées pour la synthèse du dérivé 2',3' de l'ATP. Les différences entre les chaînes se trouvent entre l'azobenzène et l'ATP. Avec dans l'ordre, un espaceur constitué de l'éthylènediamine suivi d'une molécule d'acide succinique (haut), d'une unité β -alanine (milieu) et d'une unité glycine (bas).

7.1.4.2. Bioinformatique et choix d'un dérivé 2',3' de l'ATP.

Le modèle choisit pour les expériences de docking fut un modèle par homologie de rP2X2 dans lequel la fermeture des trois sites ATP est imposée par chélation du zinc par les histidines H120 et H213. Ce modèle, issu des expériences de NMA menées par le Dr Antoine Taly et validé par des expériences biologiques, donne une conformation du site-ATP qui est corrélée à l'ouverture du canal (Jiang et al 2012a). En l'absence de structure cristallographique des récepteurs P2X dans un état actif en présence d'ATP, ce modèle semblait plus adapté qu'un modèle par homologie de rP2X2 strictement basé sur la structure du récepteur dans un état inactif.

Sur la base des résultats de marquage d'affinité, j'ai décidé d'imposer la position de l'atome C8 de l'adénine à proximité du résidu L186. J'ai utilisé les coordonnées du C8 du NCS-ATP docké à proximité du résidu L186C (cf. Fig. 4, article (Jiang et al 2011)) sur un modèle de rP2X2, pour positionner dans l'espace la fonction d'énergie permettant d'imposer une contrainte spatiale au C8 de l'adénine.

Les expériences de docking sont lancées pour les deux isomères des trois molécules. L'extraction des résultats permet de révéler des différences majeures entre les molécules et d'identifier un candidat prometteur. Seule la molécule avec l'espaceur contenant la β -Alanine présenta des différences d'interactions avec la protéine entre les isomères *cis* et *trans*. Les maléimides des isomères *cis* explorent majoritairement la surface de la protéine tandis que ceux des isomères *trans* explorent majoritairement le solvant (Fig. 41). Les résultats de docking permirent d'identifier 25 résidus à muter en cystéine (Fig. 42).

Les 25 résidus furent mutés en cystéine par mutagénèse dirigée par Adeline Martz. Un test de fonctionnalité rapide par électrophysiologie patch-clamp, consistant à tester une dose faible (10 μ M) et une dose forte d'ATP (100 μ M), permet de révéler que la quasi totalité des mutants sont fonctionnels, à part S121C, G247C et G286C (Fig. 42).

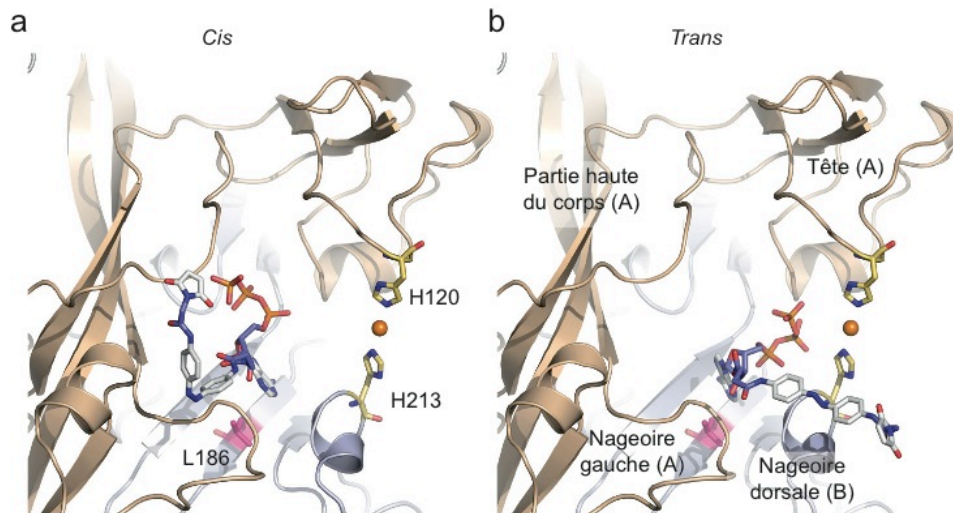


Figure 41. Dérivé β -Alanine candidat prometteur pour l'élaboration d'un PTL ATP. Docking des isomères *cis* (a) et *trans* (b) sur un modèle rP2X2. Les histidines H120 et H213 sont en représentées en sticks dorés. Le résidu L186 est coloré en magenta. La sphère orange représente le zinc.

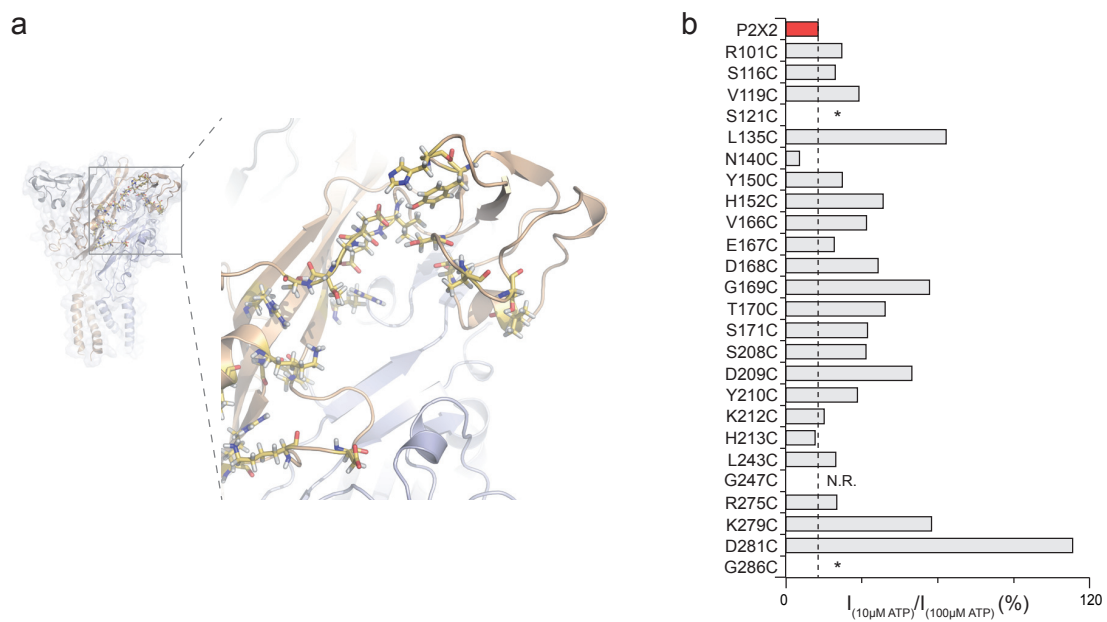


Figure 42. Identification de 25 points d'ancrage potentiels du PTL sur P2X2. (a) Cartographie des 25 résidus identifiés par docking sur un modèle de rP2X2. (b) Test de fonctionnalité préliminaire des 25 mutants cystéine.

Je me suis donc orienté vers la synthèse d'un dérivé 2',3' de l'ATP, le MAC-ATP pour MaléimideAzobenzèneCarbamoyl-ATP (MAC-ATP).

7.1.4.3. Synthèse organique d'un dérivé 2',3' de l'ATP.

La stratégie de synthèse qui fut choisie consistait à lier la chaîne photoisomérisable à l'ATP dans la dernière étape réactionnelle. Car nous savions que la chaîne hydrophobe fixée à l'ATP nous permettrait de purifier le composé final par chromatographie en phase inverse (C^{18}) et d'éviter le passage par deux étapes de purification par chromatographie d'échange d'ion et d'exclusion.

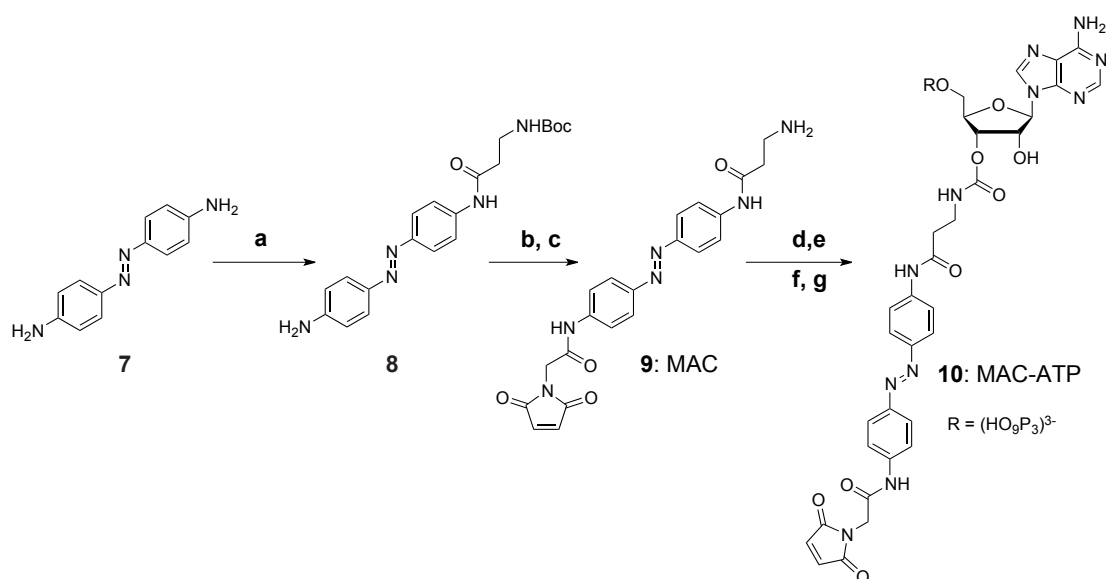


Schéma 3. Synthèse totale de MAC-ATP. Réactifs et conditions : (a) EDCI, HOBt, DIPEA, CH_2Cl_2 , RT, 12 h. (b) Chlorure d'oxalyle, DIPEA, DMAP, THF, 12 h. (c) CH_2Cl_2 , TFA 20%, 10 min. (d) Carbonyldiimidazole, DMF, tributylamine, 5°C, 12 h. (e) MeOH, 5°C, 30 min. (f) composé 9, DMF, tributylamine, 5°C, 3 h. (g) H_2O , HCl, pH 2,5, 5°C, 20 h.

La synthèse de la chaîne photoisomérisable, MaléimideAzobenzène (MA) consistait, en une première étape, à créer un lien amide entre le 4,4'-diaminoazobenzène et la Boc- β -alanine par l'utilisation d'agents de couplage classique. Le maléimide est fixé au synthon 8 par un lien amide généré par addition élimination de l'amine aromatique de 8 sur le chlorure d'acide de la N-maléoylglycine. Ensuite, le composé 9 boqué est déprotégé avant d'être engagé dans la réaction de couplage à l'ATP. Dans cette dernière étape le lien carbamate entre l'ATP et 9 est généré par addition élimination de l'amine

primaire de 9 sur l'ester cyclique 2',3' de l'ATP généré avec le carbonyldiimidazole. Dans une première manipulation, j'ai réalisé le traitement acide pour régénérer les phosphates suivi du traitement basique pour régénérer l'adénine en fin de réaction (Webb & Corrie 2001). Ce dernier traitement basique entraîna l'hydrolyse du maléimide. Je recommençais donc cette étape de couplage sans faire de traitement basique. Je réussis à isoler un dérivé azobenzène comportant les signaux RMN ^1H caractéristiques de MA et de l'ATP avec les protons du ribose et le l'adénine. Cependant on relève une dégradation du maléimide. A notre grande surprise il fut impossible d'observer la présence des trois phosphates par RMN ^{31}P . Il fut impossible d'obtenir la masse du produit. Pour vérifier la présence des trois phosphates j'ai testé la molécule par électrophysiologie patch-clamp sur les récepteurs P2X. Cette molécule est un agoniste des récepteurs P2X et son activité est photomodulable (Fig. 43).

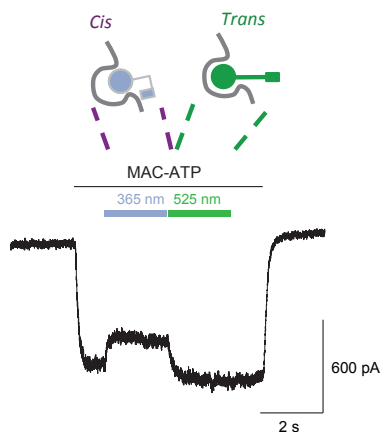


Figure 43. Photorégulation du courant induit par le MAC-ATP. Trace représentative du courant provoqué par le MAC-ATP (100 μM) enregistré sur des cellules HEK exprimant P2X2 T339S.

Nous ne sommes pas parvenus à démontrer la réactivité de cette molécule vis-à-vis des cystéines par électrophysiologie patch-clamp et par HPLC. Le test de réactivité suivi par HPLC consistait à incuber le pseudo MAC-ATP en présence de thiophénol et à regarder la diminution de l'aire du pic de thiophénol par HPLC en phase inverse (gradient 0-100% acétonitrile sur 30 min). Nous en avons donc conclu que les conditions de couplage à l'ATP ne sont pas compatibles avec le maléimide qui se dégrade pendant la réaction. Finalement, cette dernière étape ne permit pas d'isoler le produit désiré.

7.1.4.4. Discussions et perspectives.

Dans les expériences de docking, un certain nombre d'approximations ont été faites. Tout d'abord, ces expériences prennent uniquement en compte la flexibilité du ligand, le récepteur est fixe. La fonction de score utilisée est approximative. Ensuite, la position du C8 de l'adénine est imposée en utilisant une fonction d'énergie empirique qui introduit un biais. Il faut être conscient qu'il est possible, du fait de ces approximations, de passer à côté de la meilleure solution de docking. L'identification des 25 résidus à muter en cystéine comporte donc une incertitude, suggérant qu'il ne faille pas se restreindre à ces uniques positions mais étendre la liste aux résidus voisins. Les résultats de docking ont permis d'identifier un grand nombre de résidus, ceci peut s'expliquer par le manque de contraintes appliquées au ligand. De nouvelles expériences de docking seront à conduire sur la base de la nouvelle structure des récepteurs zfP2X4 dans un état actif en présence ATP. Cette structure, montrant le mode de fixation de l'ATP dans son site, constitue bien évidemment le meilleur environnement pour procéder au docking permettant l'identification des résidus à muter en cystéine.

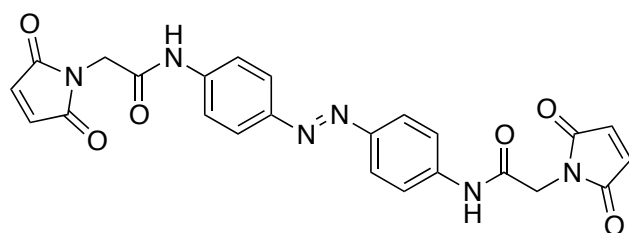
Concernant la partie synthèse, l'analyse des dérivés ATP est très délicate. Les expériences de RMN du phosphore ne nous ont pas permis de révéler la présence des phosphates sur une molécule soluble dans l'eau, retenue sur C¹⁸, ayant un spectre UV caractéristique des azobenzènes disubstitués par des liaisons amides ($\lambda_{\max} = 369 \text{ nm}$). Par ailleurs cette molécule est un agoniste des récepteurs P2X, ce qui confirme la présence des trois phosphates. L'absence de signaux en RMN du phosphore serait due au fait que les phosphates possèdent des contre-ions différents (tributylamonium, Na⁺, K⁺). En effet, ces contre-ions influencent les déplacements chimiques des phosphores, concourant à diluer leurs signaux de RMN. Le MAC-ATP est une molécule amphiphile qui pourrait s'agréger et former une microsuspension de liposome diminuant la concentration de molécules libres en solution, diluant une fois de plus les signaux de RMN.

En perspective nous avons mis en place une nouvelle stratégie de synthèse du MAC-ATP qui consisterait à synthétiser une chaîne azobenzène

7.2. Agrafe moléculaire photoisomérisable.

Comme première alternative au PTL, j'ai décidé de synthétiser une agrafe moléculaire photoisomérisable dans le but de contrôler, par la lumière, des mouvements moléculaires au sein des récepteurs P2X, pour en réguler l'activité.

Matériel et méthode.



Bis-M, (E)-N,N'-(diazène-1,2-diylbis(4,1-phénylène))bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acétamide) :

A une solution de N-maléoylglycine (1,4 g, 9,4 mmol) et de chlorure d'oxalyle (846 μ L, 9,5 mmol) dans THF (10 mL), ont été ajoutées trois gouttes de DMF. Après agitation pendant une nuit à température ambiante, ont été ajoutées goutte à goutte, la DIPEA (2 mL, 11,4 mmol) et une solution de 4,4'-diaminoazobenzène (600 mg, 1,57 mmol), de DMAP (~1 mg) dans du THF (6 mL). Après agitation à 0°C pendant 10 min, le mélange fut laissé sous agitation pendant 12 h à température ambiante, puis concentré *in vacuo*. Le mélange fut dilué dans de l'AcOEt (100 mL) et le solide trituré à AcOEt (200 mL). Les fractions ont ensuite été rassemblées et lavées avec une solution de $K_2CO_3^{2-}$ (1 M, 3 \times 100 mL), puis avec une solution d'HCl (0,01 M, 3 \times 100 mL). La phase organique fut ensuite séchée au $Na_2SO_4^{2-}$. Le produit désiré est obtenu, sans purification supplémentaire, sous forme d'une poudre marron-orangée (22%). NMR 1H (400 MHz, DMSO-*d*6) : δ = 10,62 (s, 2H), 7,86 (d, 4H), 7,76 (d, 2H), 7,16 (s, 4H), 4,33 (s, 4H). SMHR (ESI) (*m/z*), (M+H)⁺ calculé pour $C_{24}H_{18}N_6O_6$: 487,13606. Trouvé : 487,13699.s

Perspectives.

L'utilisation du Bis-M, outil prometteur, est un projet de thèse à part entière, demandant un long travail d'identification de paires de mutants cystéines, de mutagenèse et de test des doubles et simples mutants cystéine. A l'époque où j'obtenais cet outil (fin janvier 2013) nous ne disposions d'aucun double mutant cystéine. Je m'orientais donc vers une autre stratégie en vue de la photorégulation de l'activité des récepteurs P2X.

7.3. L'Optogate, une nouvelle approche optogénétique chimique.

Contexte.

La stratégie PTL appliquée aux récepteurs P2X s'est avérée être un échec. Cette stratégie ne se prête pas à un ligand aussi compliqué que l'ATP. Cette étude débute en janvier 2013, pressé par le temps nous développons une stratégie de photorégulation alternative à celle des PTLs. L'objectif est d'utiliser une molécule relativement simple et rapide à synthétiser.

Stratégie.

Cette ultime stratégie consiste à utiliser une molécule constituée d'un maléimide thiol-réactif, d'un azobenzène central et d'une charge. L'intérêt de cet outil est de lier covalamment la charge au récepteur et d'en contrôler la localisation dans le but de déstabiliser réversiblement des interactions moléculaires intra-récepteur ou ligand/récepteur.

Deux régions différentes du récepteur peuvent être ciblées, le site de liaison de l'ATP et le canal.

Concernant le site de liaison de l'ATP, la stratégie serait la suivante. Un dérivé maléimide-azobenzène chargé négativement serait fixé à proximité du site ATP. L'interaction réversible, sous irradiation lumineuse, de la charge négative avec le site ATP chargé positivement permettrait un encombrement réversiblement du site perturbant ou même empêchant la fixation de l'ATP chargé négativement. Avec un tel outil nous pourrions inactiver spécifiquement et réversiblement, sous l'action de la lumière, les récepteurs P2X.

Au niveau du canal, une molécule photoisomérisable chargée positivement pourrait perturber ou même bloquer réversiblement le passage des ions lors de l'ouverture du canal suite à une activation par l'ATP. Une telle stratégie permettrait d'inhiber les récepteurs P2X en empêchant les ions de passer au travers du canal (Fig. 44a).

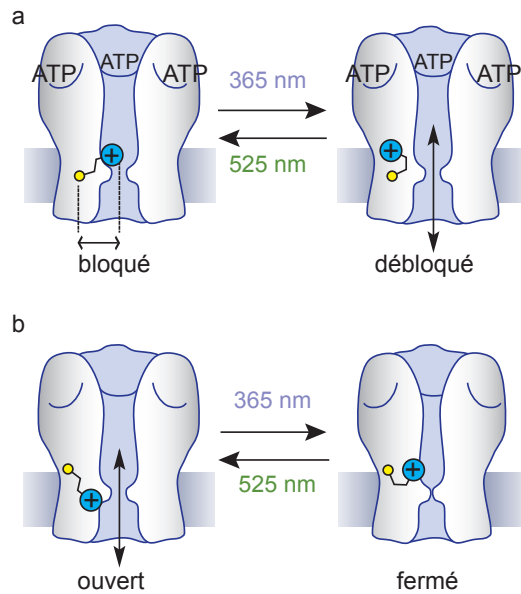


Figure 44. Stratégie alternative au PTL. (a) Blocage réversible du canal en fonction de la lumière. (b) Reprogrammation de la gate.

Des travaux antérieurs montrent qu'une modification chimique des récepteurs P2X2, porteurs de mutations dans la région transmembranaire, par des molécules réactives méthane-thiosulfonate (MTS) chargées positivement, affecte l'ouverture du canal (Rassendren et al 1997). Inspirés de ces résultats, nous décidons de contrôler réversiblement, par la lumière, la machinerie d'ouverture du canal en faisant réagir une molécule photoisomérisable chargée positivement dans la même région (Fig. 44b). Nous appellerons cette stratégie optogate.

Cet outil permettrait d'exprimer un récepteur fonctionnel *in vivo* sans perturber la physiologie de l'animal et de révéler l'implication des récepteurs P2X dans une voie de signalisation en les inhibant sélectivement.

Résultats.

La stratégie optogate est une nouvelle méthode utilisée pour le contrôle optique des récepteurs P2X. Cette stratégie consiste à reprogrammer le canal ionique pour en contrôler l'ouverture par la lumière. Nous verrons comment l'optogate nous a permis de créer un récepteur P2X insensible à l'ATP et activable, réversiblement, par la lumière.

La molécule, synthétisée par le Dr Alexandre Specht, utilisée pour reprogrammer le canal, est un dérivé maléimide éthylène azobenzène triméthyl ammonium (MEA-TMA). Cette molécule est similaire au MAQ qui fut utilisée pour le contrôle optochimique des canaux potassiques. Le MEA-TMA en solution s'isomérise rapidement depuis son isomère *trans* à son isomère *cis* par une illumination dans le proche UV (365 nm) et retourne à son isomère *trans* lentement par relaxation thermique et rapidement par une illumination dans le visible (525 nm) (Fig. 45a et 46). La reprogrammation du canal nécessite la liaison covalente du MEA-TMA à la protéine. Pour atteindre cet objectif, 19 résidus, localisés dans la partie supérieure du canal sur TM1 et TM2, ont été mutés en cystéine et associés au fond rP2X2-3T dans lequel toutes les cystéines libres ont été mutées en thréonines. Tous les mutants cystéine sont fonctionnels et possèdent des CE_{50} similaires à celles décrites dans la littérature (Li et al 2008).

Une campagne de marquage avec le MEA-TMA permis de révéler avec surprise le contrôle optique de l'activité de huit mutants (Fig. 45c). Certains de ces mutants présentent des courants de photoactivation provoqués par l'isomère *trans* et d'autres par l'isomère *cis*, définissant les « *trans*-openers » et les « *cis*-openers » respectivement. La cartographie des *trans*- et *cis*-openers sur un modèle par homologie de rP2X2, dans un état de repos, montre que les *trans*-openers sont localisés à l'interface entre les sous-unités et que les *cis*-openers sont localisés dans une même sous-unité à l'interface des hélices- α TM1 et TM2 (Fig. 45d). Les mutants présentant les courants de photorégulation les plus élevés sont I328C et V48C (Fig. 45b). Pour la suite de l'étude nous avons choisi de travailler avec I328C pour la stabilité de ses courants de photoactivation.

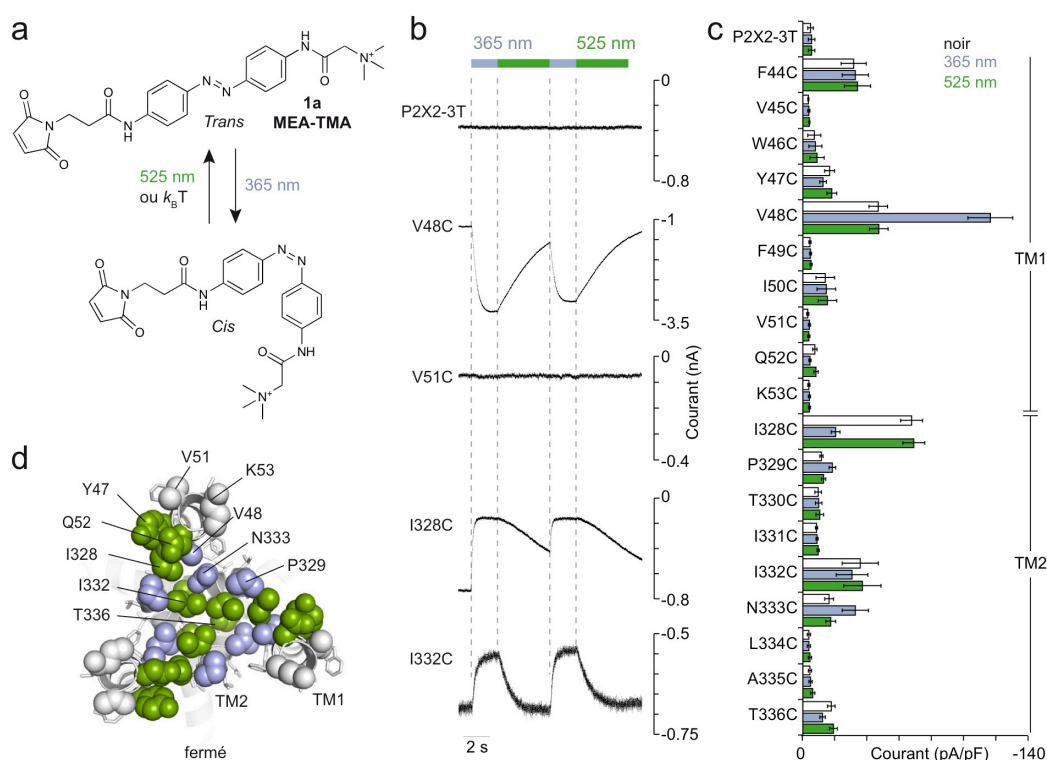


Figure 45. Le MEA-TMA lié permet le photocontrôle de l'ouverture du canal par la lumière. (a) Structure chimique des isomères *cis-trans* du MEA-TMA. (b) Courants, en cellules entières, provoqués par la lumière aux longueurs d'onde indiquées, sur des cellules HEK exprimant les mutants indiqués. Avant l'enregistrement les cellules sont traitées au MEA-TMA dans le noir. Le marquage du mutant V48C s'effectue en présence d'ATP. (c) Histogramme du criblage de l'ensemble des mutants cystéine, indiquant les densités de courant enregistrées dans le noir (barre blanche), et après irradiation à 365 nm (barre violette) et à 525 nm (barre verte) (N = 4-7, moyenne \pm sem). (d) Cartographie des résidus, *cis*-openers (sphères violettes) et *trans*-openers (sphères vertes) sur le modèle par homologie de P2X2. Vue du milieu extracellulaire, le long de l'axe de symétrie d'ordre 3, sous l'état fermé. Les sticks et les sphères grises indiquent, respectivement, les résidus et les résidus marqués insensibles à l'irradiation. Les hélices- α de TM1 et TM2 sont indiquées.

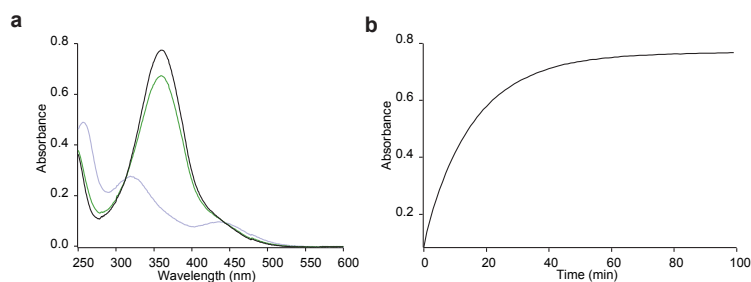


Figure 46. Cinétiques d'isomérisation du MEA-TMA libre en solution. (a) Spectre d'absorbance du MEA-TMA enregistré i), dans la solution externe d'électrophysiologie dans le noir (trace noire) ii), après une irradiation à 365 nm pendant 3 min (trace violette), et iii) après une illumination à 525 nm 3 min (trace verte). (b) relaxation thermique enregistrée à 360 nm du *cis*-MEA-TMA dans la solution externe d'électrophysiologie analysée avec une mono-exponentiel ($\tau = 16,3 \pm 0,9$ min, moyenne \pm sem.).

Les cinétiques de photo-activation et de photo-inactivation de I328C ont été évaluées par mesure de la constante de temps (τ) des courants mesurés aux différentes longueurs d'onde (Fig. 47). Les valeurs de τ de photorégulation, de l'ordre de la centaine de millisecondes, sont du même ordre de grandeur que celles observées dans des conditions physiologiques ($\tau = 0,36 \pm 0,02$ s à 525 nm avec un puissance de $4,5 \text{ mW/mm}^2$ et $\tau = 0,095 \pm 0,004$ s à 365 nm avec un puissance de $4,5 \text{ mW/mm}^2$). Cette observation suggère que le MEA-TMA est capable d'ouvrir le canal des récepteurs P2X2 à des taux approchant ceux enregistrés en présence d'ATP.

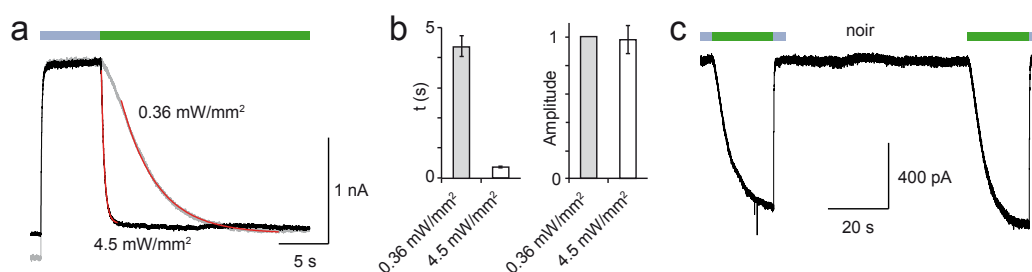


Figure 47. Cinétique d'isomérisation de l'azobenzène lié sur la position I328C. (a) L'augmentation de l'intensité lumineuse à 525 nm, (barre verte) augmente la vitesse d'activation du récepteur. Les résultats sont analysés avec une mono exponentielle décroissante (en rouge). (b) Histogramme, résumant les résultats présentés en (a), montrant les constantes de temps (τ) sans changement de l'amplitude des courants (normalisé à $0,36 \text{ mW/mm}^2$, $N = 4$, barre d'erreur représentent les sem). (c) Stabilité de l'isomère *cis* du MEA-TMA dans le noir, après activation à 525 nm (barre verte, intensité lumineuse de $0,36 \text{ mW/mm}^2$) et désactivation à 365 nm (barre violette).

Nous avons décidé, ensuite, d'étudier le mécanisme de photoactivation des récepteurs P2X2. Pour savoir si l'ouverture du canal induite par la lumière se déclenche par un mécanisme commun et comparable à l'ouverture provoquée par l'ATP, nous avons testé l'effet de la lumière (525 et 365 nm) sur la dose réponse de l'ATP sur I328C (Fig. 48). Une illumination à 525 nm qui provoque l'ouverture du canal en absence d'ATP, provoque une diminution substantielle, de $68 \pm 6\%$, des courants maximum provoqués par l'ATP avec une faible augmentation de l'affinité apparente de l'ATP ($CE_{50-525 \text{ nm}} = 1,5 \pm 0,4 \mu\text{M}$; $EC_{50-365 \text{ nm}} = 2,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$). Ces résultats suggèrent que le mécanisme d'ouverture par la lumière n'est pas commun à celui provoqué par l'ATP.

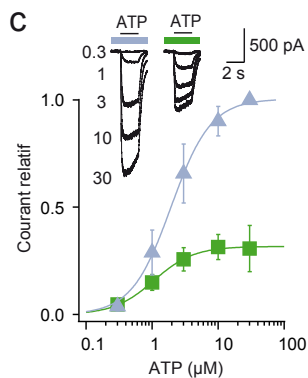


Figure 48. Photomodulation de la réponse ATP, par le MEA-TMA lié au I328C. Courbes dose réponse de l'ATP enregistrées à 365 nm (violet) et à 525 nm (vert) sur des cellules HEK exprimant le mutant I328C, marqué au MEA-TMA (N = 5, moyenne \pm sem). Les courants sont normalisés à 30 μ M ATP à 365 nm. (Encart) traces représentatives des courant ATP aux longueurs d'onde indiquées.

Pour pousser plus loin l'étude du mécanisme de photoactivation en absence d'ATP, nous avons testé une série de molécules photoisomérisables nouvellement synthétisées, incluant le MAQ, qui diffèrent dans leur structure et leur charge formelle (Fig. 49a). Les variations de la longueur de la molécule, ainsi que les variations de la taille de la charge positive n'altèrent pas les courants de photorégulation qui représentent entre 19 et 25% des courants provoqués par une dose saturante d'ATP. Une substitution du TMA, chargé positivement, par un groupement sulfonate, chargé négativement, réduit dramatiquement la quantité de courants de photorégulation, tout en gardant, qualitativement, le même profil de photorégulation (Fig. 49b). Une application ultérieure de MEA-TMA permet de restaurer essentiellement les courants de photorégulation, suggérant que le niveau de marquage par le MEA-SO₃ est faible. Une observation similaire est faite avec un dérivé non chargé le MEA-OMe (Fig. 49c). Ces données suggèrent que l'azobenzène est responsable des courants photoinduits et que la charge positive est importante pour assurer un marquage efficace. En effet, le vestibule extracellulaire, voie d'accès au canal, est hautement chargé négativement repoussant les anions et concentrant les cations à proximité du canal (Hattori & Gouaux 2012).

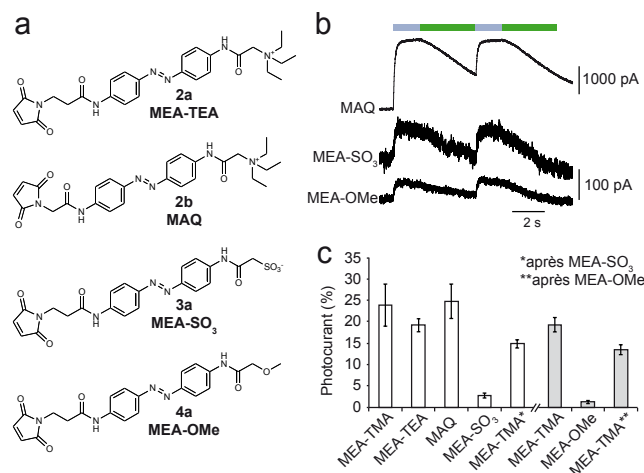


Figure 49. Importance de la charge positive du photoswitch pour le marquage des récepteurs P2X2. (a) Structures chimiques des analogues du MEA-TMA. (b) Courants, cellules entières, provoqués par la lumière sur des cellules exprimant le mutant I328C marqué avec le MAQ, le MEA-SO₃ ou le MEA-OMe comme indiqué. (c) Histogramme montrant l'amplitude des courants induits par une irradiation à 525 nm sur le mutant I328C marqué par les analogues du MEA-TMA comme indiqué, (normalisation des courants par rapport au courant provoqués par une concentration saturante d'ATP, enregistré à 365 nm). Le marquage est effectué avec 200 μ M (barre blanche) ou 80 μ M (barre grise) des analogues (N = 3-7, moyenne \pm sem).

Toutes ses données montrent que le récepteur P2X2 modifié peut être activé par la lumière sans recourir à l'ATP. Nous avons alors associé la mutation I328C avec la mutation K69A connue pour abolir la fixation de l'ATP. Le résultat est un récepteur P2X2 activé par la lumière insensible à l'ATP (Fig. 50a). Nous avons ensuite testé la sélectivité ionique de ce « light-gated P2X2 receptor » (LiP2X2R) dans des expériences de substitution ioniques (Fig. 50b). LiP2X2R reste perméable aux cations (Na⁺, Ca²⁺) et imperméable au chlore. Nous savons qu'une application prolongée d'ATP provoque la dilatation des récepteurs P2X. Nous avons mené des expériences de perméabilité au NMDG qui montrent que les LiP2X2R activés par une illumination à 525 nm sont faiblement mais instantanément perméables au NMDG ($P_{\text{NMDG}}/P_{\text{Cs}} \leq 0,17$). Cette perméabilité NMDG n'augmente pas au cours du temps (3, 30, 60 s). Ces expériences indiquent que les LiP2X2R activés par la lumière sont dans un état partiellement dilaté.

Pour finir nous avons exprimé les récepteurs LiP2X2 dans des neurones dissociés d'hippocampe de rat et démontré la capacité des LiP2X2R à photoréguler l'activité neuronale (Fig. 50c).

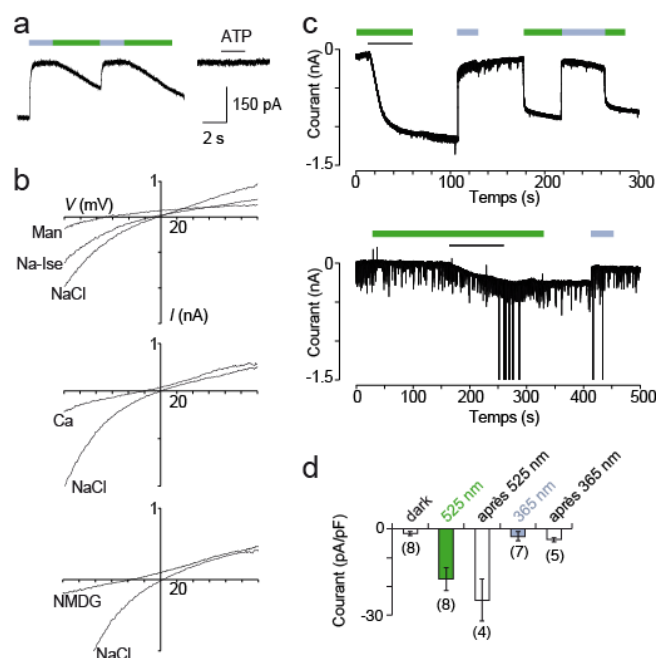


Figure 50. Un « light-gated cation-channel » insensible à l'ATP, permet le photocontrôle de l'activité synaptique et la formation de potentiel d'action dans les neurones. (a) Le mutant K69A/I328C, dans des cellules HEK, lié au MEA-TMA répond à la lumière (à gauche) mais est insensible à l'ATP (à droite, 100 μ M). (b) Courbes I/V, pour la même construction, enregistré dans différentes solutions extracellulaires (Man, mannitol ; Na-Ise, Isothionate de sodium ; Ca, calcium ; NMDG, N-méthyl-D-glucamine). Les courants induits par la lumière sont obtenus après soustraction des photocourants enregistrés à 525 nm. (Intensité lumineuse 4,5 mW/mm²) de ceux obtenus à 365 nm. (Pour le NMDG, les courants présentés sont enregistrés 60 s après le changement de longueur d'onde d'irradiation). (c) Exemple d'enregistrement des courants (avec une activité synaptique modéré et robuste) provoqués par la lumière après une courte application de 100 μ M de MEA-TMA (barre noire) sur des neurones d'hippocampe exprimant le mutant K69A/I328C. (d) Histogramme résumant la densité des courants enregistrés (moyenne \pm sem).

Nous avons développé une stratégie alternative aux PTLs permettant le photocontrôle de l'activité neuronale par l'intermédiaire d'un récepteur P2X modifié génétiquement rendu insensible au ligand endogène. LiP2X2R donne l'opportunité de disséquer le rôle physiologique des récepteurs P2X avec un signal spécifique, la lumière.

Ces travaux ont été soumis à PNAS.

Optical control of an ion channel gate

Damien Lemoine^{a,b}, Chloé Habermacher^{a,b}, Adeline Martz^{a,b}, Pierre-François Méry^{c,d,e}, Nathalie Bouquier^{c,d,e}, Fanny Diverchy^{a,b}, Antoine Taly^{f,g}, François Rassendren^{c,d,e,h}, Alexandre Specht^{a,b}, and Thomas Grutter^{a,b,1}

^aCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 7199, Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives, Équipe de Chimie et Neurobiologie Moléculaire, F-67400 Illkirch, France; ^bUniversité de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, F-67400 Illkirch, France; ^cCentre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5203, Institut de Génétique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France; ^dInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale U661, F-34000 Montpellier, France; ^eUniversités de Montpellier 1 and 2, F-34000 Montpellier, France; ^fCentre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biochimie Théorique, F-75005 Paris, France; ^gUniversité Paris Diderot, F-75005 Paris, France; ^hLaboratory of Excellence Ion Channel Science and Therapeutics (LabEx ICST), F-34000 Montpellier, France

Edited by Richard W. Aldrich, University of Texas at Austin, Austin, TX, and approved November 8, 2013 (received for review October 3, 2013)

The powerful optogenetic pharmacology method allows the optical control of neuronal activity by photoswitchable ligands tethered to channels and receptors. However, this approach is technically demanding, as it requires the design of pharmacologically active ligands. The development of versatile technologies therefore represents a challenging issue. Here, we present optogating, a method in which the gating machinery of an ATP-activated P2X channel was reprogrammed to respond to light. We found that channels covalently modified by azobenzene-containing reagents at the transmembrane segments could be reversibly turned on and off by light, without the need of ATP, thus revealing an agonist-independent, light-induced gating mechanism. We demonstrate photocontrol of neuronal activity by a light-gated, ATP-insensitive P2X receptor, providing an original tool devoid of endogenous sensitivity to delineate P2X signaling in normal and pathological states. These findings open new avenues to specifically activate other ion channels independently of their natural stimulus.

azobenzene photoswitch | purinergic receptors

Significance

Engineered light-sensitive ion channels offer the opportunity to govern electrical activity of neurons. To date, developed strategies have relied on specific actions on either ligand-binding or permeation pathways. Here we developed a unique and versatile method, in which the gating machinery of an ATP-activated channel (purinergic P2X receptor) was reprogrammed to respond to light. We found that channels covalently modified by azobenzene-containing reagents at the transmembrane segments could be reversibly turned on and off by light, without the need of the natural ligand (here ATP). We demonstrate photocontrol of neuronal activity by a light-gated P2X receptor, in which the natural sensitivity to ATP was genetically removed. These light-gated P2X receptors represent valuable tools for investigating their physiological functions.

Author contributions: D.L., C.H., P.-F.M., A.T., F.R., A.S., and T.G. designed research; D.L., C.H., A.M., P.-F.M., N.B., F.D., A.T., F.R., and A.S. performed research; D.L., C.H., P.-F.M., A.S., and T.G. analyzed data; and F.R., A.S., and T.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹To whom correspondence should be addressed. E-mail: grutter@unistra.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1318715110/-/DCSupplemental.

Discussions et perspectives.

Cette étude présente la stratégie optogate, une stratégie optogénétique chimique simple à mettre en œuvre. A la différence de la technique PTL, cette approche ne nécessite pas d'étapes de modification chimique d'un ligand et n'est donc pas dépendante de l'avancement des connaissances pharmacologiques sur le récepteur ciblé. Les synthèses chimiques décrites sont simples à réaliser et donnent accès à une gamme de molécules photoisomérisables permettant de cibler le mécanisme d'ouverture du canal d'un récepteur. Cette stratégie, ne ciblant pas un site de liaison pharmacologique, pourrait s'appliquer aux autres canaux ioniques.

De manière inattendue, le marquage de I328C par le MEA-TMA n'est pas un simple marquage chimique. La charge positive du MEA-TMA lui permet de cibler les canaux cations non sélectifs des récepteurs P2X avec une pseudo affinité. Nous parlons de pseudo affinité car Le MEA-TMA ne semble pas cibler un éventuel site cation. La variation de la taille du cation et de sa position relative (changement de longueur de la molécule) ne changeant pas fondamentalement la capacité de la molécule à ouvrir le canal est un argument allant à l'encontre d'une interaction avec un site cation. Une faible diminution de l'intensité des courants de photorégulation est tout de même observée pour le MEA-TEA, la molécule la plus longue. Nous n'avons pas réalisé de statistiques, nous ne pouvons donc pas dire si cette différence est significative. De ce fait, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de l'existence d'un site d'interaction pour la charge positive. La stœchiométrie de marquage n'est pas connue et reste à déterminer par des expériences futures.

Les courants de photorégulation obtenus avec les dérivés non chargés et chargés négativement sont qualitativement équivalents aux courants de photorégulation médiés par le MEA-TMA, suggérant que le mécanisme de photorégulation est inhérent à l'azobenzène. Nos données ne permettent pas d'identifier le mécanisme de photo-ouverture du canal, mais suggèrent que l'isomère étendu *trans* du MEA-TMA modifie les interactions entre les hélices- α TM2, stabilisant le canal dans un état ouvert. Le mécanisme d'activation par la lumière reste indéterminé.

Les courants de photorégulation représentent environ 25% des courants provoqués par l'ATP. Nous ne pouvons pas exclure que la faible amplitude des courants de photorégulation soit due à un marquage incomplet des récepteurs. Une application de MEA-TMA pendant un temps de dix minutes rend les expériences de patch-clamp impossibles. Le marquage avec l'isomère *trans*, stable thermiquement, provoque l'ouverture des canaux entraînant sur plusieurs minutes la mort cellulaire. Un des moyens pour surmonter cette toxicité cellulaire serait de procéder à un marquage avec l'isomère *cis*.

En partant du postulat que la réaction du MEA-TMA sur les récepteurs est totale, l'ouverture incomplète du canal pourrait expliquer la diminution de courant. Une des manières de tester cette hypothèse serait de réaliser des expériences en canal unique qui permettent de mesurer la conductance du canal. Une conductance réduite, révélerait un canal qui laisse moins bien passer les ions et donc partiellement ouvert. Les expériences de substitution ioniques nous permettent d'apporter un élément de réponse. La perméabilité calcique relative de I328C/K69A à 525 nm ($P_{Ca}/P_{Na} = 0,43 \pm 0,09$) est réduite d'un facteur 5 par rapport à celle déterminée pour P2X2-3T ($P_{Ca}/P_{Na} = 2,08 \pm 0,22$) en présence d'ATP (300 μ M). Cette diminution pourrait s'expliquer en partie par une sous-estimation de la perméabilité due à une inhibition des courants de photorégulation par le calcium. En effet les récepteurs P2X sont inhibés par le calcium (Evans et al 1996). Cette observation ne nous permet pas d'exclure une photo-ouverture partielle du canal gênant le passage du calcium. Les mesures de perméabilité révèlent une dilatation partielle des récepteurs activés par la lumière, ce qui est incompatible avec une ouverture incomplète du canal. Ce point reste à étudier plus en détail.

Une des façons de vérifier la diminution de la perméabilité calcique et la dilatation partielle, serait respectivement de réaliser des expériences d'imagerie calcique (Fura2, ou par mesure des courant calciques fractionnaires (Egan & Khakh 2004, Schneggenburger et al 1993)) et des expériences d'incorporation du YO-PRO (large cation organique fluorescent, intercalant de l'ADN).

Nous avons démontré que LiP2X2R permet de contrôler rapidement et réversiblement l'activité de neurones de l'hippocampe, démontrant son

potentiel. L'optogate est une stratégie potentiellement applicable aux autres récepteurs P2X, ouvrant la voie pour étudier leur rôle physiopathologique avec un niveau de précision inégalé.

8. Conclusions générales et perspectives.

Aux cours de ces travaux nous avons localisé par marquage d'affinité dirigé le site ATP et piégé deux états ligandés. L'un inactif et l'autre partiellement ligandé permettant de potentialiser la réponse ATP, suggérant un état précédant l'activation des récepteurs. L'état inactif laisse des questions en suspens. S'agit-il d'un état complètement ligandé ? Est-ce un état mimant un état désensibilisé, ou est-ce un autre état ligandé précédant l'activation de P2XR ? Plus que jamais la cristallisation de ces états intermédiaires représente une voie porteuse pour disséquer le mécanisme d'activation des récepteurs P2X.

Dans une seconde étude nous avons révélé le mécanisme d'ouverture des récepteurs P2X en démontrant la corrélation entre l'ouverture du canal et les profondes modifications conformationnelles du site ATP engendrées par la liaison d'agonistes.

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les récepteurs P2X manquent de molécules sélectives pour P2XR et interP2XR. La compréhension des modifications conformationnelles s'opérant dans le récepteur suite à liaison d'un agoniste représente un enjeu pour l'élaboration de molécules avec une sélectivité accrue.

La stratégie des PTL, détaillée dans la section 1.3.2., est un outil capable de contrôler spécifiquement un sous-type de récepteurs avec un stimulus lumineux permettant une précision spatiotemporelle redoutable. Toutefois, cette stratégie possède un désavantage majeur car elle est exigeante sur le plan chimique, en nécessitant une modification du ligand pouvant s'avérer fastidieuse. Nous avons développé une stratégie innovante, alternative aux PTLs, qui ne demande aucun travail sur le ligand. Cette approche, développée sur les récepteurs P2X, est appelée optogate. L'optogate permet de reprogrammer un canal ionique pour lui conférer une sensibilité à la lumière. Le canal est génétiquement modifié pour porter une cystéine en amont de la gate, assurant la liaison covalente d'un photoswitch chargé permettant l'ouverture rapide et réversible du canal par la lumière. Nous avons créé un « light-gated P2X receptor » (LiP2XR) laissant la possibilité de garder un récepteur sensible

ou non à l'ATP. Ce LiP2XR a démontré sa puissance en permettant le contrôle de l'activité de neurones d'hippocampe, traçant la voie pour étudier le rôle, physiologique et pathologique, des récepteurs P2X dans le système nerveux avec un niveau de précision inégalé.

Le mécanisme de photoactivation des récepteurs P2X reste encore un mystère. Nous étudierons ce mécanisme en détail, en procédant à des expériences de mutagenèse pour identifier les interactions entre le photoswitch et le canal et en générant des concatémères dans l'objectif de déterminer la stœchiométrie de marquage. Les objectifs futurs sont d'étendre cet outil aux autres récepteurs P2X et plus largement aux autres récepteurs canaux.

Annexes

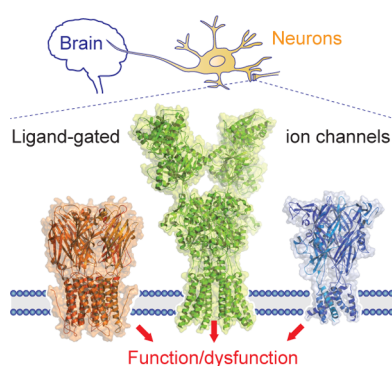
Ligand-Gated Ion Channels: New Insights into Neurological Disorders and Ligand Recognition

Damien Lemoine,[‡] Ruotian Jiang,[‡] Antoine Taly,[†] Thierry Chataigneau,[‡] Alexandre Specht,[§] and Thomas Grutter^{*‡}

[‡]Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France

[§]Laboratoire de Chimie Bioorganique, UMR 7199 CNRS, Conception et Application de Molécules Bioactives, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch, France

[†]Laboratoire de Biochimie Théorique, UPR 9080 CNRS, Institut de Biologie Physico-Chimique, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France



CONTENTS

1. Introduction	6286		
2. A Brief History of the LGICs	6286		
3. General Description of the LGIC Superfamily	6286		
3.1. Pentameric Receptors	6286		
3.2. Tetrameric Receptors	6287		
3.3. Trimeric Receptors	6288		
4. Contribution of LGIC Dysfunction to Disease	6288		
4.1. Alzheimer's Disease	6288		
4.1.1. nAChRs	6288		
4.1.2. iGluRs	6289		
4.1.3. GABA _A Rs	6290		
4.1.4. P2XRs	6290		
4.2. Parkinson's Disease	6290		
4.2.1. iGluRs	6290		
4.2.2. P2XRs	6290		
4.2.3. nAChRs and GABA _A Rs	6290		
4.3. Epilepsy	6291		
4.3.1. GABA _A Rs	6291		
4.3.2. nAChRs	6291		
4.3.3. iGluRs	6292		
4.3.4. P2XRs	6292		
4.4. Hyperekplexia	6292		
4.5. Neuropathic Pain	6293		
4.5.1. P2XRs	6293		
4.5.2. iGluRs	6293		
5. LGICs as Attractive Targets for New Therapeutic Agents	6294		
5.1. Pentameric Receptors	6294		
5.1.1. nAChRs as Targets in AD Treatment	6294	5.1.2. nAChRs as Targets in PD Treatment	6295
		5.1.3. nAChRs as Targets in Neuropathic Pain Treatment	6295
		5.1.4. GABA _A Receptors as Targets in Epilepsy Treatment	6295
		5.1.5. GABA _A Receptors as Targets in AD Treatment	6296
		5.1.6. GABA _A Receptors as Targets in Pain Treatment	6296
		5.2. Tetrameric Receptors	6296
		5.2.1. AMPA Receptors as Targets in AD Treatment	6296
		5.2.2. AMPA Receptors as Targets in PD Treatment	6296
		5.2.3. AMPA Receptors as Targets in Epilepsy Treatment	6296
		5.2.4. NMDA Receptors as Targets in AD Treatment	6296
		5.2.5. NMDA Receptors as Targets in PD Treatment	6296
		5.2.6. NMDA Receptors as Targets in Epilepsy Treatment	6296
		5.2.7. NMDA Receptors as Targets in Pain Treatment	6297
		5.2.8. Kainate Receptors as Targets in Epilepsy Treatment	6297
		5.3. Trimeric Receptors	6297
		6. Three-Dimensional Structures Illuminate the Mechanisms of Ligand Recognition	6297
		6.1. Pentameric Receptors	6297
		6.1.1. Orthosteric-Binding Sites	6297
		6.1.2. Allosteric-Binding Sites	6299
		6.2. Tetrameric Receptors	6301
		6.2.1. Orthosteric-Binding Sites	6302
		6.2.2. Allosteric-Binding Sites	6303
		6.3. Trimeric Receptors	6304
		6.3.1. Orthosteric-Binding Sites	6304
		6.3.2. Allosteric-Binding Sites	6306
		7. Conclusion and Perspective	6308

Special Issue: 2012 Ion Channels and Disease

Received: February 24, 2012

Published: September 18, 2012

Intermediate closed channel state(s) precede(s) activation in the ATP-gated P2X2 receptor

Ruotian Jiang¹, Antoine Taly,² Damien Lemoine¹, Adeline Martz¹, Alexandre Specht³ and Thomas Grutter^{1*}

¹Laboratoire de Biophysicochimie des Récepteurs Canaux; Conception et Application de Molécules Bioactives; CNRS UMR 7199; Faculté de Pharmacie; Université de Strasbourg; Strasbourg, France; ²Laboratoire de Biochimie Théorique; Institut de Biologie Physico-Chimique; CNRS UPR 9080; Paris, France;

³Laboratoire de Chimie Bioorganique; Conception et Application de Molécules Bioactives; CNRS UMR 7199; Faculté de Pharmacie; Université de Strasbourg; Strasbourg, France

Keywords: purinergic receptor, gating mechanism, ligand-gated ion channel, neurotransmitter receptor, affinity labeling, zinc-binding sites

Abbreviations: NCS-ATP, 8-thio-cyano-ATP; TNP-ATP, 2',3'-O-(2,4,6-trinitrophenyl)-ATP; zfP2X4, zebrafish ATP-gated P2X4; rP2X2, rat ATP-gated P2X2; HEK-293, human embryonic kidney cells; MTSEA, 2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide; P_{open} , nominal channel opening probability

Submitted: 06/22/12

Revised: 07/17/12

Accepted: 07/17/12

<http://dx.doi.org/10.4161/chan.21520>

*Correspondence to: Thomas Grutter;
Email: grutter@unistra.fr

Addendum to: Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T. Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J* 2012; 31:2134-43; PMID:22473210; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2012.75>.

The molecular mechanism underlying receptor resolved in the absence of ATP channel opening in response to agonist binding remains a challenging issue of P2X receptors and revealed the conformation of the closed state. This structure has aroused a wide interest and motivated several studies as evidenced by extensive efforts to define precisely the agonist-binding site^{2,5} to identify conformational changes that follow ATP binding^{6,7} and to propose a mechanism of ion conduction through the open pore^{8,9}. Recently we used the site-directed affinity labeling strategy to trap ATP-binding sites in the rat (r) P2X2 receptor with the sulfhydryl-reactive P2X2 agonist 8-thio-cyano-ATP (NCS-ATP), a potent P2X2 agonist, when covalently labeled in the ATP-binding site at position Leu186 likely favors the tightening mechanism, but not the channel opening mechanism. Our data predict the existence of intermediate or preactivation state(s) trapped by NCS-ATP, in which tightening of the binding site is favored while the channel is still closed. We propose that this (these) intermediate ATP-bound state(s) prime(s) channel gating in the P2X2 receptor.

Introduction

Bibliographie

- Abell AD, Jones MA, Neffe AT, Aitken SG, Cain TP, et al. 2007. Investigation into the P3 Binding Domain of m-Calpain Using Photoswitchable Diazo- and Triazene-dipeptide Aldehydes: New Anticataract Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 50: 2916-20
- Acuña-Castillo C, Coddou C, Bull P, Brito J, Huidobro-Toro J. 2007. Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor. *Journal of neurochemistry* 101: 17-26
- Acuña-Castillo C, Morales B, Huidobro-Toro J. 2000. Zinc and copper modulate differentially the P2X4 receptor. *Journal of neurochemistry* 74: 1529-37
- Baenziger J, Corringer P-J. 2011. 3D structure and allosteric modulation of the transmembrane domain of pentameric ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology* 60: 116-25
- Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer R. 2004. Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nature neuroscience* 7: 1381-86
- Baqi Y, Hausmann R, Rosefort C, Rettinger J, Schmalzing G, Müller C. 2011. Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X2 receptor. *Journal of medicinal chemistry* 54: 817-30
- Barrera N, Ormond S, Henderson R, Murrell-Lagnado R, Edwardson J. 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. *The Journal of biological chemistry* 280: 10759-65
- Bartels E, Wassermann N, Erlanger B. 1971. Photochromic activators of the acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 1820-23
- Baxter A, Bent J, Bowers K, Braddock M, Brough S, et al. 2003. Hit-to-Lead studies: the discovery of potent adamantane amide P2X7 receptor antagonists. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13: 4047-50
- Beharry A, Sadovski O, Woolley G. 2011. Azobenzene photoswitching without ultraviolet light. *Journal of the American Chemical Society* 133: 19684-87
- Bernier L-P, Ase A, Boué-Grabot E, Séguéla P. 2012. P2X4 receptor channels form large noncytolytic pores in resting and activated microglia. *Glia* 60: 728-37
- Blaustein R, Cole P, Williams C, Miller C. 2000. Tethered blockers as molecular 'tape measures' for a voltage-gated K⁺ channel. *Nature structural biology* 7: 309-11
- Bo X, Jiang L-H, Wilson H, Kim M, Burnstock G, et al. 2003. Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Molecular pharmacology* 63: 1407-16
- Boyden E, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. 2005. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience* 8: 1263-68

- Brake A, Wagenbach M, Julius D. 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* 371: 519-23
- Braun K, Rettinger J, Ganso M, Kassack M, Hildebrandt C, et al. 2001. NF449: a subnanomolar potency antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 364: 285-90
- Brotherton-Pleiss C, Dillon M, Ford A, Gever J, Carter D, et al. 2010. Discovery and optimization of RO-85, a novel drug-like, potent, and selective P2X3 receptor antagonist. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 20: 1031-36
- Buell G, Lewis C, Collo G, North R, Surprenant A. 1996. An antagonist-insensitive P2X receptor expressed in epithelia and brain. *The EMBO journal* 15: 55-62
- Burnstock G. 2008. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nature reviews. Drug discovery* 7: 575-90
- Burnstock G. 2009. Purines and sensory nerves. *Handbook of experimental pharmacology*: 333-92
- Callaway E, Katz L. 1993. Photostimulation using caged glutamate reveals functional circuitry in living brain slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 7661-65
- Canepari M, Nelson L, Papageorgiou G, Corrie J, Ogden D. 2001. Photochemical and pharmacological evaluation of 7-nitroindolyl- and 4-methoxy-7-nitroindolyl-amino acids as novel, fast caged neurotransmitters. *Journal of neuroscience methods* 112: 29-42
- Cao L, Young M, Broomhead H, Fountain S, North R. 2007. Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27: 12916-23
- Caro L, Moreau C, Estrada-Mondragón A, Ernst O, Vivaudou M. 2012. Engineering of an artificial light-modulated potassium channel. *PloS one* 7
- Carter A, Sabatini B. 2004. State-dependent calcium signaling in dendritic spines of striatal medium spiny neurons. *Neuron* 44: 483-93
- Carter D, Alam M, Cai H, Dillon M, Ford A, et al. 2009. Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: The discovery of RO-4, a dual P2X(3)/P2X(2/3) antagonist for the treatment of pain. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19: 1628-31
- Chen C, Akopian A, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood J. 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-31
- Chessell I, Hatcher J, Bountra C, Michel A, Hughes J, et al. 2005. Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114: 386-96

- Clarke C, Benham C, Bridges A, George A, Meadows H. 2000. Mutation of histidine 286 of the human P2X4 purinoceptor removes extracellular pH sensitivity. *The Journal of physiology* 523 Pt 3: 697-703
- Clyne J, LaPointe L, Hume R. 2002. The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. *The Journal of physiology* 539: 347-59
- Cockayne D, Dunn P, Zhong Y, Rong W, Hamilton S, et al. 2005. P2X2 knockout mice and P2X2/P2X3 double knockout mice reveal a role for the P2X2 receptor subunit in mediating multiple sensory effects of ATP. *The Journal of physiology* 567: 621-39
- Cockayne D, Hamilton S, Zhu Q, Dunn P, Zhong Y, et al. 2000. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011-15
- Coddou C, Acuña-Castillo C, Bull P, Huidobro-Toro J. 2007. Dissecting the facilitator and inhibitor allosteric metal sites of the P2X4 receptor channel: critical roles of CYS132 for zinc potentiation and ASP138 for copper inhibition. *The Journal of biological chemistry* 282: 36879-86
- Coddou C, Lorca R, Acuña-Castillo C, Grauso M, Rassendren F, Huidobro-Toro J. 2005. Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. *Toxicology and applied pharmacology* 202: 121-31
- Coddou C, Morales B, González J, Grauso M, Gordillo F, et al. 2003. Histidine 140 plays a key role in the inhibitory modulation of the P2X4 nucleotide receptor by copper but not zinc. *The Journal of biological chemistry* 278: 36777-85
- Coddou C, Yan Z, Obsil T, Huidobro-Toro J, Stojilkovic S. 2011. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews* 63: 641-83
- Collo G, North R, Kawashima E, Merlo-Pich E, Neidhart S, et al. 1996. Cloning OF P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 16: 2495-507
- Coull J, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, et al. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438: 1017-21
- Deisseroth K. 2011. Optogenetics. *Nature methods* 8: 26-29
- Ding S, Sachs F. 1999a. Ion Permeation and Block of P2X 2 Purinoceptors: Single Channel Recordings. *Journal of Membrane Biology* 172
- Ding S, Sachs F. 1999b. Single channel properties of P2X2 purinoceptors. *The Journal of general physiology*
- Donato L, Mourot A, Davenport C, Herbivo C, Warther D, et al. 2012. Water-soluble, donor-acceptor biphenyl derivatives in the 2-(o-nitrophenyl)propyl series: highly efficient two-photon uncaging of the neurotransmitter γ -aminobutyric acid at $\lambda = 800$ nm. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51: 1840-43

- Donnelly-Roberts D, McGaraughty S, Shieh C-C, Honore P, Jarvis M. 2008. Painful purinergic receptors. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 324: 409-15
- Donnelly-Roberts D, Namovic M, Han P, Jarvis M. 2009a. Mammalian P2X7 receptor pharmacology: comparison of recombinant mouse, rat and human P2X7 receptors. *British journal of pharmacology* 157: 1203-14
- Donnelly-Roberts D, Namovic M, Surber B, Vaidyanathan S, Perez-Medrano A, et al. 2009b. [3H]A-804598 ([3H]2-cyano-1-[(1S)-1-phenylethyl]-3-quinolin-5-ylguanidine) is a novel, potent, and selective antagonist radioligand for P2X7 receptors. *Neuropharmacology* 56: 223-29
- Egan T, Khakh B. 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 3413-20
- Eickhorst A, Berson A, Cockayne D, Lester H, Khakh B. 2002. Control of P2X(2) channel permeability by the cytosolic domain. *The Journal of general physiology* 120: 119-31
- Evans R. 2010. Structural interpretation of P2X receptor mutagenesis studies on drug action. *British journal of pharmacology* 161: 961-71
- Evans R, Lewis C, Buell G, Valera S, North R, Surprenant A. 1995. Pharmacological characterization of heterologously expressed ATP-gated cation channels (P2x purinoceptors). *Molecular pharmacology* 48: 178-83
- Evans R, Lewis C, Virginio C, Lundstrom K, Buell G, et al. 1996. Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *The Journal of physiology* 497 (Pt 2): 413-22
- Ezquerro J, Pedregal C, Rubio A, Yruretagoyena B, Escribano A, Sánchez-Ferrando F. 1993. Stereoselective reactions of lithium enolates derived from N-BOC protected pyroglutamic esters. *Tetrahedron* 49: 8665-78
- Fenko L, Yizhar O, Deisseroth K. 2011. The development and application of optogenetics. *Annual review of neuroscience* 34: 389-412
- Ferrari D, Pizzirani C, Adinolfi E, Lemoli R, Curti A, et al. 2006. The P2X7 receptor: a key player in IL-1 processing and release. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 176: 3877-83
- Fields R, Burnstock G. 2006. Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nature reviews. Neuroscience* 7: 423-36
- Gandelman M, Levy M, Cassina P, Barbeito L, Beckman J. 2013. P2X7 receptor-induced death of motor neurons by a peroxynitrite/FAS-dependent pathway. *Journal of neurochemistry* 126: 382-88
- Garcia-Guzman M, Soto F, Gomez-Hernandez JM, Lund P-E, Stühmer W. 1997. Characterization of Recombinant Human P2X4 Receptor Reveals Pharmacological Differences to the Rat Homologue. *Molecular pharmacology* 51: 109-18

- Gerevich Z, Zadori Z, Köles L, Kopp L, Milius D, et al. 2007. Dual effect of acid pH on purinergic P2X3 receptors depends on the histidine 206 residue. *The Journal of biological chemistry* 282: 33949-57
- Gever J, Cockayne D, Dillon M, Burnstock G, Ford A. 2006. Pharmacology of P2X channels. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 452: 513-37
- Gever J, Soto R, Henningsen R, Martin R, Hackos D, et al. 2010. AF-353, a novel, potent and orally bioavailable P2X3/P2X2/3 receptor antagonist. *British journal of pharmacology* 160: 1387-98
- Gordon G, Baimoukhametova D, Hewitt S, Rajapaksha W, Fisher T, Bains J. 2005. Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. *Nature neuroscience* 8: 1078-86
- Gordon G, Iremonger K, Kantevari S, Ellis-Davies G, MacVicar B, Bains J. 2009. Astrocyte-mediated distributed plasticity at hypothalamic glutamate synapses. *Neuron* 64: 391-403
- Gorostiza P, Volgraf M, Numano R, Szobota S, Trauner D, Isacoff E. 2007. Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 10865-70
- Hampton A, Patel AD, Maeda M, Hai TT, Chang CD, et al. 1982. Use of adenine nucleotide derivatives to assess the potential of exo-active-site-directed reagents as species- or isozyme-specific enzyme inactivators. 3. Synthesis of adenosine 5'-triphosphate derivatives with N6- or 8-substituents bearing iodoacetyl groups. *Journal of Medicinal Chemistry* 25: 373-81
- Harvey AJ, Abell AD. 2000. Azobenzene-Containing, Peptidyl α -Ketoesters as Photobiological Switches of α -Chymotrypsin. *Tetrahedron* 56: 9763-71
- Hattori M, Gouaux E. 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485: 207-12
- He M-L, Gonzalez-Iglesias A, Stojilkovic S. 2003. Role of nucleotide P2 receptors in calcium signaling and prolactin release in pituitary lactotrophs. *The Journal of biological chemistry* 278: 46270-77
- He M-L, Koshimizu T-A, Tomić M, Stojilkovic S. 2002. Purinergic P2X(2) receptor desensitization depends on coupling between ectodomain and C-terminal domain. *Molecular pharmacology* 62: 1187-97
- Hechler B, Magnenat S, Zighetti M, Kassack M, Ullmann H, et al. 2005. Inhibition of platelet functions and thrombosis through selective or nonselective inhibition of the platelet P2 receptors with increasing doses of NF449 [4,4',4'',4'''-(carbonylbis(imino-5,1,3-benzenetriylbis-(carbonylimino)))tetrakis-benzene-1,3-disulfonic acid octasodium salt]. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 314: 232-43
- Hibell A, Thompson K, Xing M, Humphrey P, Michel A. 2001. Complexities of measuring antagonist potency at P2X(7) receptor orthologs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296: 947-57

- Hohenegger M, Waldhoer M, Beindl W, Böing B, Kreimeyer A, et al. 1998. G α -selective G protein antagonists. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 346-51
- Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic M, Hsieh G, Zhu C, et al. 2006. A-740003 [N-(1-((cyanoimino)(5-quinolinylamino) methyl)amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 319: 1376-85
- Inoue K, Tsuda M, Koizumi S. 2004. ATP- and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: chronic pain and microglia: involvement of the ATP receptor P2X4. *Journal of pharmacological sciences* 94: 112-14
- Jacobson K, Kim Y, Wildman S, Mohanram A, Harden T, et al. 1998. A pyridoxine cyclic phosphate and its 6-azoaryl derivative selectively potentiate and antagonize activation of P2X1 receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 41: 2201-06
- Jacobson KA, Jarvis MF, Williams M. 2002. Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. *Journal of Medicinal Chemistry* 45: 4057-93
- Jahangir A, Alam M, Carter D, Dillon M, Bois D, et al. 2009. Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 2: The discovery of RO-51, a potent and selective, dual P2X(3)/P2X(2/3) antagonist for the treatment of pain. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19: 1632-35
- Jaime-Figueroa S, Greenhouse R, Padilla F, Dillon M, Gever J, Ford A. 2005. Discovery and synthesis of a novel and selective drug-like P2X(1) antagonist. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 15: 3292-95
- Jarvis M. 2010. The neural-glia purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends in neurosciences* 33: 48-57
- Jarvis M, Burgard E, McGaraughty S, Honore P, Lynch K, et al. 2002. A-317491, a novel potent and selective non-nucleotide antagonist of P2X3 and P2X2/3 receptors, reduces chronic inflammatory and neuropathic pain in the rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 17179-84
- Jarvis M, Khakh B. 2009. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56: 208-15
- Jarvis M, Wismer C, Schweitzer E, Yu H, van Biesen T, et al. 2001. Modulation of BzATP and formalin induced nociception: attenuation by the P2X receptor antagonist, TNP-ATP and enhancement by the P2X(3) allosteric modulator, cibacron blue. *British journal of pharmacology* 132: 259-69
- Jiang L, Mackenzie A, North R, Surprenant A. 2000a. Brilliant blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X(7) receptors. *Molecular pharmacology* 58: 82-88
- Jiang L, Rassendren F, Surprenant A, North R. 2000b. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. *The Journal of biological chemistry* 275: 34190-96

- Jiang R, Lemoine D, Martz A, Taly A, Gonin S, et al. 2011. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 9066-71
- Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Cunrath O, Grutter T. 2012a. Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *The EMBO journal* 31: 2134-43
- Jiang R, Taly A, Lemoine D, Martz A, Specht A, Grutter T. 2012b. Intermediate closed channel state(s) precede(s) activation in the ATP-gated P2X2 receptor. *Channels (Austin, Tex.)* 6: 398-402
- Jones C, Chessell I, Simon J, Barnard E, Miller K, et al. 2000. Functional characterization of the P2X(4) receptor orthologues. *British journal of pharmacology* 129: 388-94
- Kamei T, Fukaminato T, Tamaoki N. 2012. A photochromic ATP analogue driving a motor protein with reversible light-controlled motility: controlling velocity and binding manner of a kinesin-microtubule system in an in vitro motility assay. *Chemical communications (Cambridge, England)* 48: 7625-27
- Kaplan J, Forbush B, Hoffman J. 1978. Rapid photolytic release of adenosine 5'-triphosphate from a protected analogue: utilization by the Na:K pump of human red blood cell ghosts. *Biochemistry* 17: 1929-35
- Kassack M, Braun K, Ganso M, Ullmann H, Nickel P, et al. 2004. Structure-activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X1 receptor antagonist. *European journal of medicinal chemistry* 39: 345-57
- Kawate T, Michel J, Birdsong W, Gouaux E. 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460: 592-98
- Khakh B, Bao X, Labarca C, Lester H. 1999a. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nature neuroscience* 2: 322-30
- Khakh B, North R. 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76: 51-69
- Khakh B, Proctor W, Dunwiddie T, Labarca C, Lester H. 1999b. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19: 7289-99
- Kim Y, Brown S, Harden T, Boyer J, Dubyak G, et al. 2001. Structure-activity relationships of pyridoxal phosphate derivatives as potent and selective antagonists of P2X1 receptors. *Journal of Medicinal Chemistry* 44: 340-49
- King B, Liu M, Pintor J, Gualix J, Miras-Portugal M, Burnstock G. 1999. Diinosine pentaphosphate (IP5I) is a potent antagonist at recombinant rat P2X1 receptors. *British journal of pharmacology* 128: 981-88
- Klapperstück M, Büttner C, Nickel P, Schmalzing G, Lambrecht G, Markwardt F. 2000. Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X(1) and P2X(7) receptors. *European journal of pharmacology* 387: 245-52

- Kotnis S, Bingham B, Vasilyev D, Miller S, Bai Y, et al. 2010. Genetic and functional analysis of human P2X5 reveals a distinct pattern of exon 10 polymorphism with predominant expression of the nonfunctional receptor isoform. *Molecular pharmacology* 77: 953-60
- Kramer R, Mourot A, Adesnik H. 2013. Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nature neuroscience* 16: 816-23
- Krejci P, Murakami S, Prochazkova J, Trantirek L, Chlebova K, et al. 2010. NF449 is a novel inhibitor of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling active in chondrocytes and multiple myeloma cells. *The Journal of biological chemistry* 285: 20644-53
- Kühlbrandt W. 2000. Bacteriorhodopsin--the movie. *Nature* 406: 569-70
- Lambrecht G, Rettinger J, Bäumert H, Czeche S, Damer S, et al. 2000. The novel pyridoxal-5'-phosphate derivative PPNDs potently antagonizes activation of P2X(1) receptors. *European journal of pharmacology* 387: 21
- Landry Y, Gies J. 2003. Pharmacologie. Des cibles vers l'indication thérapeutique. *DUNOD*
- Lazarowski E, Boucher R, Harden T. 2003. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Molecular pharmacology* 64: 785-95
- Lemoine D, Jiang R, Taly A, Chataigneau T, Specht A, Grutter T. 2012. Ligand-Gated Ion Channels: New Insights into Neurological Disorders and Ligand Recognition. *Chemical reviews*
- Lester H, Krouse M, Nass M, Wassermann N, Erlanger B. 1980. A covalently bound photoisomerizable agonist: comparison with reversibly bound agonists at Electrophorus electroplaques. *The Journal of general physiology* 75: 207-32
- Levitz J, Pantoja C, Gaub B, Janovjak H, Reiner A, et al. 2013. Optical control of metabotropic glutamate receptors. *Nature neuroscience* 16: 507-16
- Lewis C, Neidhart S, Holy C, North R, Buell G, Surprenant A. 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377: 432-35
- Lewis C, Surprenant A, Evans R. 1998. 2',3'-O-(2,4,6- trinitrophenyl) adenosine 5'-triphosphate (TNP-ATP)--a nanomolar affinity antagonist at rat mesenteric artery P2X receptor ion channels. *British journal of pharmacology* 124: 1463-66
- Li M, Chang T-H, Silberberg S, Swartz K. 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. *Nature neuroscience* 11: 883-87
- Liu M, King B, Dunn P, Rong W, Townsend-Nicholson A, Burnstock G. 2001. Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurons. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 296: 1043-50

- Liu X, Ma W, Surprenant A, Jiang LH. 2009. Identification of the amino acid residues in the extracellular domain of rat P2X(7) receptor involved in functional inhibition by acidic pH. *British journal of pharmacology* 156: 135-42
- Liu X, Surprenant A, Mao H-J, Roger S, Xia R, et al. 2008. Identification of key residues coordinating functional inhibition of P2X7 receptors by zinc and copper. *Molecular pharmacology* 73: 252-59
- Lorca R, Coddou C, Gazitúa M, Bull P, Arredondo C, Huidobro-Toro J. 2005. Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. *Journal of neurochemistry* 95: 499-512
- Lynch K, Touma E, Niforatos W, Kage K, Burgard E, et al. 1999. Molecular and functional characterization of human P2X(2) receptors. *Molecular pharmacology* 56: 1171-81
- Matsuzaki M, Ellis-Davies G, Nemoto T, Miyashita Y, Iino M, Kasai H. 2001. Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nature neuroscience* 4: 1086-92
- Maurizi MR, Ginsburg A. 1986. Adenosine 5'-triphosphate analogs as structural probes for Escherichia coli glutamine synthetase. *Biochemistry* 25: 131-40
- Mayer M. 2005. Glutamate receptor ion channels. *Current opinion in neurobiology* 15: 282-88
- McNally W, DeHart P, Lathia C, Whitfield L. 2000. Distribution of [¹⁴C]suramin in tissues of male rats following a single intravenous dose. *Life sciences* 67: 1847-57
- Michel A, Kaur R, Chessell I, Humphrey P. 2000. Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *British journal of pharmacology* 130: 513-20
- Miller P, Smart T. 2010. Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. *Trends in pharmacological sciences* 31: 161-74
- Mio K, Ogura T, Yamamoto T, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, et al. 2009. Reconstruction of the P2X(2) receptor reveals a vase-shaped structure with lateral tunnels above the membrane. *Structure (London, England : 1993)* 17: 266-75
- Moreau C, Dupuis J, Revilloud J, Arumugam K, Vivaudou M. 2008. Coupling ion channels to receptors for biomolecule sensing. *Nature nanotechnology* 3: 620-25
- Mourot A, Fehrentz T, Le Feuvre Y, Smith C, Herold C, et al. 2012. Rapid optical control of nociception with an ion-channel photoswitch. *Nature methods* 9: 396-402
- Mourot A, Kienzler M, Banghart M, Fehrentz T, Huber F, et al. 2011. Tuning photochromic ion channel blockers. *ACS chemical neuroscience* 2: 536-43
- Mulryan K, Gitterman D, Lewis C, Vial C, Leckie B, et al. 2000. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X1 receptors. *Nature* 403: 86-89

- Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K. 2009. Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Molecular pain* 5: 20
- Nakazawa K, Ohno Y. 1997. Effects of neuroamines and divalent cations on cloned and mutated ATP-gated channels. *European journal of pharmacology* 325: 101-08
- North R. 2002. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological reviews* 82: 1013-67
- North R, Jarvis M. 2013. P2X receptors as drug targets. *Molecular pharmacology* 83: 759-69
- North RA, Surprenant A. 2000. Pharmacology of Cloned P2X Receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40: 563-80
- Oesterhelt D, Stoeckenius W. 1971. Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium. *Nature: New biology* 233: 149-52
- Parvathenani L, Tertyshnikova S, Greco C, Roberts S, Robertson B, Posmantur R. 2003. P2X7 mediates superoxide production in primary microglia and is up-regulated in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of biological chemistry* 278: 13309-17
- Pearson D, Abell AD. 2006. Photoswitch inhibitors of [small alpha]-chymotrypsin-increased substitution and peptidic character in peptidomimetic boronate esters. *Organic & biomolecular chemistry* 4: 3618-25
- Pearson D, Alexander N, Abell A. 2008. Improved photocontrol of alpha-chymotrypsin activity: peptidomimetic trifluoromethylketone photoswitch enzyme inhibitors. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 14: 7358-65
- Pshezhetsky A, Nifant'ev I. 2005. *Patent No. WO2005012247A1*
- Ralevic V, Burnstock G. 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacological reviews* 50: 413-92
- Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North R, Surprenant A. 1997. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *The EMBO journal* 16: 3446-54
- Rettinger J, Schmalzing G, Damer S, Müller G, Nickel P, Lambrecht G. 2000. The suramin analogue NF279 is a novel and potent antagonist selective for the P2X(1) receptor. *Neuropharmacology* 39: 2044-53
- Roger S, Pelegrin P, Surprenant A. 2008. Facilitation of P2X7 receptor currents and membrane blebbing via constitutive and dynamic calmodulin binding. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 6393-401
- Schneggenburger R, Zhou Z, Konnerth A, Neher E. 1993. Fractional contribution of calcium to the cation current through glutamate receptor channels. *Neuron* 11: 133-43
- Sensi S, Paoletti P, Bush A, Sekler I. 2009. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nature reviews. Neuroscience* 10: 780-91

- Shepherd G, Pologruto T, Svoboda K. 2003. Circuit analysis of experience-dependent plasticity in the developing rat barrel cortex. *Neuron* 38: 277-89
- Soto F, Garcia-Guzman M, Gomez-Hernandez J, Hollmann M, Karschin C, Stühmer W. 1996. P2X4: an ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 3684-88
- Soto F, Lambrecht G, Nickel P, Stühmer W, Busch A. 1999. Antagonistic properties of the suramin analogue NF023 at heterologously expressed P2X receptors. *Neuropharmacology* 38: 141-49
- Stein M, Breit A, Fehrentz T, Gudermann T, Trauner D. 2013. Optical Control of TRPV1 Channels. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52: 9845-48
- Stein M, Middendorp S, Carta V, Pejo E, Raines D, et al. 2012. Azo-propofols: photochromic potentiators of GABA(A) receptors. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 51: 10500-04
- Stoop R, Surprenant A, North R. 1997. Different sensitivities to pH of ATP-induced currents at four cloned P2X receptors. *Journal of neurophysiology* 78: 1837-40
- Surprenant A, North R. 2009. Signaling at purinergic P2X receptors. *Annual review of physiology* 71: 333-59
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North R, Buell G. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science (New York, N.Y.)* 272: 735-38
- Szobota S, Gorostiza P, Del Bene F, Wyart C, Fortin D, et al. 2007. Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron* 54: 535-45
- Thompson A, Lester H, Lummis S. 2010. The structural basis of function in Cys-loop receptors. *Quarterly reviews of biophysics* 43: 449-99
- Tochitsky I, Banghart M, Mouro A, Yao J, Gaub B, et al. 2012. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nature chemistry* 4: 105-11
- Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, et al. 2003. P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424: 778-83
- Ulmann L, Hatcher J, Hughes J, Chaumont S, Green P, et al. 2008. Up-regulation of P2X4 receptors in spinal microglia after peripheral nerve injury mediates BDNF release and neuropathic pain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 11263-68
- Virginio C, Church D, North R, Surprenant A. 1997. Effects of divalent cations, protons and calmidazolium at the rat P2X7 receptor. *Neuropharmacology* 36: 1285-94
- Virginio C, MacKenzie A, Rassendren F, North R, Surprenant A. 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nature neuroscience* 2: 315-21

- Virginio C, North R, Surprenant A. 1998a. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *The Journal of physiology* 510 (Pt 1): 27-35
- Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North R. 1998b. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Molecular pharmacology* 53: 969-73
- Volgraf M, Gorostiza P, Numano R, Kramer R, Isacoff E, Trauner D. 2006. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nature chemical biology* 2: 47-52
- Webb M, Corrie J. 2001. Fluorescent coumarin-labeled nucleotides to measure ADP release from actomyosin. *Biophysical journal* 81: 1562-69
- Wildman S, Brown S, King B, Burnstock G. 1999a. Selectivity of diadenosine polyphosphates for rat P2X receptor subunits. *European journal of pharmacology* 367: 119-23
- Wildman S, Brown S, Rahman M, Noel C, Churchill L, et al. 2002. Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). *Molecular pharmacology* 62: 957-66
- Wildman S, King B, Burnstock G. 1999b. Modulatory activity of extracellular H⁺ and Zn²⁺ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. *British journal of pharmacology* 128: 486-92
- Wirkner K, Sperlagh B, Illes P. 2007. P2X3 receptor involvement in pain states. *Molecular neurobiology* 36: 165-83
- Wolf C, Rosefort C, Fallah G, Kassack M, Hamacher A, et al. 2011. Molecular determinants of potent P2X2 antagonism identified by functional analysis, mutagenesis, and homology docking. *Molecular pharmacology* 79: 649-61
- Wright M, Miller AD. 2006. Novel fluorescent labelled affinity probes for diadenosine-5' ,5'''-P1,P4-tetraphosphate (Ap4A)-binding studies. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16: 943-48
- Wyart C, Del Bene F, Warp E, Scott E, Trauner D, et al. 2009. Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461: 407-10
- Wyatt L, Godar S, Khoja S, Jakowec M, Alkana R, et al. 2013. Sociocommunicative and Sensorimotor Impairments in Male P2X4-Deficient Mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* 38: 1993-2002
- Xiong K, Peoples R, Montgomery J, Chiang Y, Stewart R, et al. 1999. Differential modulation by copper and zinc of P2X2 and P2X4 receptor function. *Journal of neurophysiology* 81: 2088-94
- Yan Z, Khadra A, Li S, Tomic M, Sherman A, Stojilkovic S. 2010. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 14213-24

- Yan Z, Liang Z, Tomic M, Obsil T, Stojilkovic S. 2005. Molecular determinants of the agonist binding domain of a P2X receptor channel. *Molecular pharmacology* 67: 1078-88
- Young M, Fisher J, Fountain S, Ford R, North R, Khakh B. 2008. Molecular shape, architecture, and size of P2X4 receptors determined using fluorescence resonance energy transfer and electron microscopy. *The Journal of biological chemistry* 283: 26241-51
- Zemkova H, He M-L, Koshimizu T-a, Stojilkovic S. 2004. Identification of ectodomain regions contributing to gating, deactivation, and resensitization of purinergic P2X receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 6968-78
- Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno L, Tsunoda S, et al. 2011. The microbial opsin family of optogenetic tools. *Cell* 147: 1446-57