HAL
open science

Exploration structurale et dynamique du phénomène d'activation des récepteurs P2Xs par de nouveaux outils optochimiques

Chloé Habermacher

▶ **To cite this version:**

Chloé Habermacher. Exploration structurale et dynamique du phénomène d'activation des récepteurs P2Xs par de nouveaux outils optochimiques. Neurobiologie. Université de Strasbourg, 2015. Français. NNT : 2015STRAJ050 . tel-01372903

HAL Id: tel-01372903

https://theses.hal.science/tel-01372903v1

Submitted on 27 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

UMR7199 – Laboratoire de Conception et

Application de Molécules Bioactives

THÈSE DE DOCTORAT

présentée par :

Chloé HABERMACHER

soutenue le : **25 septembre 2015**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Spécialité : Neurobiologie Moléculaire

Exploration structurale et dynamique du phénomène d'activation des récepteurs P2Xs par de nouveaux outils optochimiques

Dr CORRINGER Pierre-Jean	Directeur de Recherche, CNRS	Rapporteur
Dr RONDARD Philippe	Directeur de Recherche, INSERM	Rapporteur
Pr HIBERT Marcel	Professeur, Université de Strasbourg	Président
Dr GRUTTER Thomas	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de Thèse
Dr CORDERO-ERAUSQUIN Matilde	Chargé de Recherche, CNRS	Membre Invité

Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'équipe Chimie et Neurobiologie du Laboratoire de Conception et Application de Molécules Bioactives (UMR7199) à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg.

Il a été financé par une bourse doctorale accordée par l'institution The International Center for Frontier Research in Chemistry (CONV/2001/01/CIFR-N°157).

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury pour l'intérêt porté à mes travaux: tout d'abord le professeur Marcel Hibert qui me fait l'honneur de présider mon jury de thèse, ainsi que les docteurs Philippe Rondard et Pierre-Jean Corringer qui ont accepté avec enthousiasme le travail fastidieux de juger ce manuscrit et enfin le docteur Matilde Cordero-Erausquin qui a promptement accepté de se joindre à eux.

Je remercie tout particulièrement mon directeur de thèse, Dr Thomas Grutter, sans qui je n'aurais certainement pas découvert l'univers passionnant de l'électrophysiologie. Ton cours sur les canaux potassiques où tu as su me transmettre ton enthousiasme et ta passion pour ce monde un peu particulier des canaux ioniques a été décisif. Par la suite, ton exigence et ton optimisme à toute épreuve ont été des moteurs durant ces trois années de thèse. Je te remercie sincèrement pour la rigueur scientifique que tu nous inculques, la liberté que tu accordes dans les différents projets, mais également ta disponibilité quotidienne qui a été essentielle à la réussite de ces travaux.

Je souhaite également remercier le Dr Alexandre Specht pour son aide si précieuse en synthèse chimique, sa réactivité lors de mes demandes de molécules, sa disponibilité permanente et ses conseils avisés qui m'ont été très utiles lors des facéties du MAM.

Un grand merci au Dr Damien Lemoine qui m'a presque tout appris en ce qui concerne l'électrophysiologie. Plus qu'un mentor, tu as su me guider par tes suggestions et tes encouragements et je garde finalement un excellent souvenir des nombreuses heures de cohabitation forcées devant le poste de patch, sans parler de l'entraînement de nos rats obèses. Merci pour tout !

Je tiens également à remercier du fond du cœur Adeline, qui a été une vraie fée pour moi. Outre toute l'aide scientifique, si précieuse, et ton investissement dans mon projet, ton soutien permanent et tes attentions au quotidien m'ont permis de m'épanouir et de faire de cette thèse une superbe aventure.

Merci à Seb d'être un super compagnon de thèse, qui a su animer la vie au labo. Ton imagination débordante va me manquer.

Merci également à Thierry, le premier gaulois électrophysiologiste, pour ses blagues légendaires et Fred, l'expert de la bioluminescence, pour l'approvisionnement en tout genre (machines à café, bonbons, charcuterie italienne, vers luisants…).

Je remercie chaleureusement tous les « petits nouveaux » (dixit celle qui fait partie des murs) : Mahboubi pour ta bonne humeur permanente et communicative, Laurie pour avoir également besoin du marchepieds, Bastien pour ton intérêt pour la muscu qui m'a valu l'organisation d'un tournoi de bras de fer mémorable, Juline pour ton efficacité au poste de patch. Bonne chance à vous tous, c'est sûr, vous ferez un Nature !

En dehors des murs de cette fameuse faculté de Pharmacie que je n'arrive pas à quitter, de précieux amis ont participé à la réussite de cette thèse : Florence qui m'a offert par deux fois des vacances salutaires inoubliables, Marie, mon élève téméraire des pistes rouges dont l'amitié et le rire me soutiennent malgré la distance, Anne qui a toujours gonflé son matelas pour recueillir une franc-comtoise à la capitale, Aurélia discrète mais toujours là pour moi, Marlène, trop récemment arrivée à Strasbourg, compagne de soirées anti-déprime. Merci à vous toutes les filles pour votre formidable amitié! Merci également à Alban, le meilleur compagnon aventurier, et Edouard, toujours là quand tout le monde déserte !

Mes plus grands remerciements sont adressés à ma famille qui a su me soutenir et m'encourager tout le long de cette aventure. Merci d'avoir toujours été là pour moi, d'avoir tout fait pour que je puisse réussir mes rêves, de me permettre de me ressourcer dès que j'en ai besoin, et de me faire relativiser quant la science prend le pas sur le reste.

Merci enfin à Alex, ma rockstar ou mon aide de vie selon le moment, qui a du supporter ma mauvaise humeur, mes doutes et récriminations, mon absence durant trois longues années, mais qui a su me changer les idées au quotidien.

SOMMAIRE

SOMMAIRE 1
ABBREVIATIONS 4
LISTE DES TABLES ET FIGURES 10
INTRODUCTION 13
Chapitre 1 : Aspects physiologiques des récepteurs P2Xs 13
1. Généralités sur les récepteurs membranaires et les canaux ioniques 13
1.1. Généralités sur les récepteurs membranaires 13
1.2. Le concept de canaux ioniques 15
1.3. Description générale des LGICs 17
1.3.1. Les récepteurs pentamériques 18
1.3.2. Les récepteurs tétramériques 19
1.3.3. Les récepteurs trimériques 20
2. Les récepteurs P2Xs 20
2.1. La signalisation purinergique : origine et dégradation de l'ATP extracellulaire 21
2.2. Physiologie 24
2.2.1. Le contrôle de la formation du thrombus 25
2.2.2. La neuromodulation 27
2.2.3. La nociception 29
2.2.4. La douleur neuropathique 30
2.2.5. Le processus d'angiogénèse dans un contexte tumoral 31
2.3. Pharmacologie 32
2.3.1. Les agonistes 33
2.3.2. Les antagonistes 35
2.3.3. Les modulateurs allostériques 36
2.3.4. Les molécules développées en vue d'une application thérapeutique 39
Chapitre 2 : Aspects moléculaires des récepteurs P2Xs 41
1. Description structurale 41
1.1. Architecture Générale 41
1.2. Le site orthostérique 43
1.2.1. Travaux antérieurs à la résolution de la structure cristallographique 43
1.2.2. Site de liaison révélé par la structure cristallographie 47
1.3. Le domaine transmembranaire 48
1.3.1. Les hélices transmembranaires 48
1.3.2. Localisation du pore 49
1.3.3. La perméation des ions 50
1.4. Les voies d'accès extracellulaires 53
2. Le phénomène de gating 54
2.1. Les mouvements de la tête et des nageoires de l'ectodomaine 55
2.1.1. Fermeture de la mâchoire 55
2.1.2. Mouvement des feuillets et boucles bordant le site de liaison 58

2.2. Les mouvements des feuillets extracellulaires ... 60
2.2.1. Mouvements de la partie inférieure du corps du récepteur ... 61
2.2.2. Mouvements de la partie supérieure du corps du récepteur ... 62
2.3. Les mouvements des segments transmembranaires ... 63
2.4. Les mouvements des domaines intracellulaires ... 67
3. Mode de fonctionnement allostérique ... 68
3.1. Modèles allostériques ... 69
3.1.1. Modèle MWC ... 69
3.1.2. Modèle KNF ... 70
3.1.3. Autres modèles ... 70
3.2. Différents états allostériques des récepteurs P2Xs ... 71
3.2.1. Etat intermédiaire de haute affinité ... 71
3.2.2. Etat dilaté ... 72
3.2.3. Etat désensibilisé ... 74
3.2.4. Les états sous-conductants ... 75
3.3. Modèle allostérique appliqué aux récepteurs P2Xs ... 76
Chapitre 3 : Les dérivés d'azobenzènes, des outils puissants pour l'exploration biologique ... 78
1. Généralités sur le groupement azobenzène ... 78
1.1. L'isomérisation ... 79
1.2. Effet des substitutions ... 81
2. Applications biologiques du photoswitch ... 82
2.1. Contraintes inhérentes à l'application biologique ... 82
2.2. Applications pharmacologiques ... 83
2.2.1. Ligands photochromiques en optopharmacologie ... 84
2.2.2. Ligands photoswitchables en optogénétique : stratégie PTL ... 87
2.2.2.1. Principe et Molécules disponibles ... 87
2.2.2.2. Challenges à relever ... 90
2.2.3. Applications *in vitro* et *in vivo* remarquables ... 91
2.3. Applications structurales : crosslinkers photoisomérisables ... 95
2.3.1. Généralités sur le photocontrôle structural ... 95
2.3.2. Crosslinkers photoisomérisables ... 97
2.3.2.1. Applications aux peptides ... 97
2.3.2.2. Applications aux macromolécules ... 100
OBJECTIFS DE LA THESE ... 103
RESULTATS ... 105
1. Développement d'un outil optochimique pour photoréguler l'activité des récepteurs P2Xs : la stratégie d'optogating ... 105
1.1. Contexte ... 105
1.2. Stratégie ... 105
1.3. Matériel et Méthodes ... 106
1.4. Résultats ... 109
1.5. Discussion ... 113
1.6. Article 1 : Optical control of an ion channel gate (2013) ... 115

2. Exploration des mécanismes d'optogating et d'optoblocking 129
2.1. Stratégie 129
2.2. Matériel et Méthodes 129
2.3. Résultats 130
2.4. Discussion 133
3. Développement d'une sonde moléculaire 134
3.1. Contexte 134
3.2. Stratégie I : les crosslinkers photoclivables 135
3.3. Matériel et méthodes 136
3.4. Résultats 137
3.5. Discussion 138
3.6. Stratégie II : les agrafes photoisomérisables 138
3.7. Matériel et Méthodes 139
3.8. Résultats 140
3.9. Discussion 158
3.10. Article 2 : Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel . 164
4. Exploration des mouvements des hélices TM2 intracellulaires au cours du gating 191
4.1. Contexte 191
4.2. Stratégie 191
4.3. Matériel et Méthodes 193
4.4. Résultats 194
5.1. Discussion 198
5. Exploration des cinétiques et de la désensibilisation 199
5.1. Contexte 199
5.2. Stratégie 200
5.3. Matériel et Méthodes 200
5.4. Résultats 201
5.5. Discussion 203
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 205
ANNEXES 207
1. Article de revue 207
2. Alignement de séquence 255
BIBLIOGRAPHIE 261

ABBREVIATIONS

2-meSATP	2-(méthylthio)adénosine 5’-triphosphate
3,3’-bisQ	dibromure de 3,3’-bis(α-(triméthylammonium)methyl)azobenzène
4-GluAzo	dérive azobenzène du glutamate (2S,4R)-4-substitué
5-BDBD	5-(3-bromophényl)-1,3-dihydro-2*H*-benzofuro[3,2-*e*]-1,4-diazépin-2-one
5-HT	sérotonine
5-IW	5-iodowillardine
A317491	acide 5-((((3-phénoxyphényl)methyl)((1S)-1,2,3,4-tétrahydro-1-naphthalènyl) amino) carbonyl)-1,2,4-benzènetricarboxylique
AAQ	azobenzène acrylamide quaternaire
ABC	ATP binding cassette
ABDM	4,4'-azobenzène-dimaléimide
ADP	adénosine 5‘-diphosphate
AF-353	5-(5-iodo-4-méthoxy-2-(1-méthyléthyl)phénoxy)-2,4-pyrimidine diamine hydrochloride
AFM	microscopie de force atomique
AMP	adénosine 5‘-monophosphate
AMPA	acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl)propanoïque
AMPB	acide 4-aminométhyl-phénylazobenzoique
AMPP	acide (3-(3-aminométhyl)phénylazo)phénylacétique
AP-1	activator protein (facteur de transcription)
AP2	azo-propofol
Ap_4A	P^1,P^4-di(adénosine-5’) tétraphosphate
Ap_5A	P^1,P^5-di(adénosine-5’) pentaphosphate
APB	acide 4-amino-phénylazobenzoique
Ap_nG	adénosine polyphosphate guanosine
AR	site de reconnaissance de l’ATP
ARN	acide ribonucléique
ASIC	acid-sensing ion channel (canaux ioniques sensibles aux protons)
ATA-3	Azo-tétrazole-AMPA-3

ATP	adénosine 5‘-triphosphate
AZ11645373	3-[1-[[(3'-Nitro[1,1'-biphényl]-4-yl)oxy]méthyl]-3-(4-pyridinyl)propyl]-2,4-thiazolidinedione
BBG	Brilliant blue G
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BEI	binding efficiency index
BMA	bis-maléimide-azobenzène
BPDB	4,4'-bis(4-(2-chloroacétamido)phényl)diazenylbiphényl
BPDBS	4,4'-bis(4-(2-chloroacétamido)phényl)diazenylbiphényl-2,2'-disulfonate
BR	bactériorhodopsine
BrACh	bromoacétylcholine
BSBCA	3,3’-bis(sulfonato)-4,4’-bis(chloroacétamido)azobenzène
Bz-ATP	2',3'-O-(4-benzoyl-benzoyl)-adénosine-5'-triphosphate
bZIP	basic leucin zipper
CaMKII	protein kinase dépendante du calcium et de la calmoduline de typeII
cAMP	adenosine 5’-monophosphate cyclique
CAP	catabolite activator protein
CB3GA	Cibacron Blue 3GA
CE_{50}	concentration efficace médiane
CFP	cyan fluorescent protein
CGRP	calcitonin gene-related peptide (peptide relié au gène de la calcitonine)
CI_{50}	concentration inhibitrice médiane
ConA	concavalline A
CTP	cytidine-5’-triphosphate
DENAQ	Di-éthyl-amine-azobenzène ammonium quaternaire
DF	dorsal fin
D-MAG	maléimide-azobenzène-D-glutamate
DMSO	diméthylsulfoxyde
DRG	dorsal root ganglion
DTT	dithiothréitol
E-NPP	ectonucléotides pyrophosphatase/phosphodiestérase
E-NTPDase	ectonucléosides triphosphates diphosphohydrolase

ERK2	extracellular signal-regulated kinase de type 2
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
FSEC	fluorescence-detection size-exclusion chromatography
GABA	acide γ-aminobutyrique
$GABA_AR$	récepteur GABA de type A
GAL4	yeast transcription activator protein
GCN4	general control protein
GFP	green fluorescent protein
GluCl	canal chlore active par le glutamate
GlyR	récepteur de la glycine
HBD	Hydrogen Bond Donnor
HCN	Hyperpolarisation-activated Cyclic-Nucleotid modulated Cation Non-selective Channel
HEK	human embryonic kidney
HIF-1	Hypoxia inducible factor
ICAM	Intercellular adhesion molecule
iGluR	récepteur ionotropique du glutamate
Ip_4I	diinosine tétraphosphate
Ip_5I	diinosine pentaphosphate
KA	Kolmer Agduhr
KCC2	transporteur membranaire cation-chlorure
KNF	modèle de Koshland, Némethy et Filmer
LBD	ligand binding domain
LF	left flipper
LFA-1	leukocyte function-associated antigen-1
LGIC	ligand gated ion channel (récepteur canal)
M	segment transmembranaire
MAACh	maléimide-azobenzène-acétylcholine
MAG	maléimide-azobenzène-glutamate
MAHoCh	maléimide-azobenzène-homocholine
MAM	maléimide-azobenzène-maléimide
MAQ	maléimide-azobenzène-ammonium quaternaire

MBTA	iodure de 4-(N-maleimido)benzyltriméthylammonuim
ME	microscopie électronique
MEA-TMA	maléimide éthylène azobenzène triméthylammonium
mEPSC	courant miniature excitateur postsynaptique
MLCK	kinase de la chaîne légère de la myosine
MPC088	(*E*)-*N*-(2-Aminoéthyl)-4-((4-((4-(4-hydroxy-3,5-diisopropylphényl)butanamido)méthyl) phényl)diazenyl)benzamide
MPO	myéloperoxidase
MRS2159	pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl-4'-carboxylate
MRS2220	acide cyclic pyridoxine-$\alpha^{4,5}$-monophosphate-6-azophényl-2',5'-disulfonique
MRS2257	pyridoxal-5’-phosphonate 6-azophényl 3’,5’-bisméthylènephosphonate
MTS	méthanethiosulfonate
MTSEA	hydrobromure de 2-aminoéthyl méthanethiosulfonate
MTSES	2-sulfonatoéthyl methanethiosulfonate
MTSET	bromure de 2-(triméthylammonium)éthyl méthanethiosulfonate
MTSM	2-méthyl méthanethiosulfonate
MWC	modèle allostérique de Monod, Wyman et Changeux
MyoD	facteur de transcription myogénique codé par le chromosome 11
nAChR	récepteur nicotinique à l’acétylcholine
NDPK	nucleoside diphosphate kinase
NF023	acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-3,1-phénylène carbonylimino)bis-1,3,5-napththalène trisulfonique
NF110	acide 4,4',4'',4'''-[Carbonylbis[imino-5,1,3-benzènetriylbis(carbonylimino)]] tétrakis benzène sulfonique
NF279	acide 8,8'-(carbonylbis(imino-4, 1-phénylènecarbonylimino-4,1-phénylène carbonyl imino)) bis-1,3,5-naphthalènetrisulfonique
NF449	acide 8,8'-(Carbonylbis(imino-5,1,3-benzènetriylbis(carbonylimino)))tétrakis-benzène -1,3-disulphonique
NF770	acide 7,7’-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene) carbonylimino))bis-1-methoxy-naphthalene-3,6-disulfonique
NF778	acide 6,6’-(carbonylbis(imino-3,1-phenylenecarbonylimino-3,1-(4-methyl-phenylene) carbonylimino))bis-1-methoxy-naphthalene-3,5-disulfonique

NMA	analyse en modes normaux
NMDA	acide N-méthyl-D-aspartique
NMDG	N-méthyl-D-glucamine
NTD	domaine N-terminal
P2X	récepteur ionotropique purinergique de type 2
P2Y	récepteur métabotropique purinergique de type 2
PAP	phénylazophénlylalanine
PCL	ligand photochromique
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PDB	protein data bank
PI3K	phopshatidylinositol-kinase de type 3
PPADS	acide pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl-2',4'-disulphonique
PPAPA	pyridoxal-5-phosphate-6-azophényl aldéhyde
PPNDS	acide pyridoxal-5'-phosphate-6-(2´-naphthylazo-6'-nitro-4´,8´-disulphonique)
PPS	potentiel post-synaptique
PSB1011	disodium 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)-4-sulfophenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate
PSB10211	sodium 1-amino-4-[3-(4,6-dichloro[1,3,5]triazine-2-ylamino)phenylamino]-9,10-dioxo-9,10-dihydroanthracene-2-sulfonate
PTL	photoswitched tethered ligand
QAQ	ammonium quaternaire-azobenzéne- ammonium quaternaire
QBr	3- (α-bromométhyl)-3'-(α- (triméthylammonium)méthyl)azobenzène
RB2	Reactive blue 2
RGC	retinal ganglion cell
RO-51	2-[[4-Amino-5-[5-iodo-4-méthoxy-2-(1-méthyléthyl)phénoxy]-2,4-pyrimidinyl] amino]-1,3-propanediol
RO-85	1-Méthyl-3-phényl-1H-thièno[2,3-c]pyrazole-5-carboxylic acid [(R)-2-(4-acétyl-pipérazin-1-yl)-1-méthyl-éthyl]-amide
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	espèces réactives de l'oxygène
SCAM	substitued cysteine accessibility method
SCN-ATP	8-thiocyano-adénosine 5'-triphosphate

SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
SPARK	synthetic photoizomerisable azobenzene-regulated K+ channel
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine
TF	facteur tissulaire
TIRF	total internal reflection fluorescence microscopy
TKR	récepteur à activité tyrosine kinase
TM	segment transmembranaire
TMRM	tétraméthyl rhodamine méthyl ester
TNP-ATP	2’,3’-O-(2,4,6-trinitrophényl) adénosine 5’-triphosphate
TPSA	topological *polar surface* area
TRIS	2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
TrkB	récepteur à activité tyrosine kinase
TRPV	transient receptor potential channels vanilloid (sensible à la capsaÏcine)
TTHY3	canal chlore à large conductance
UAS	Upstream Activation Sequence
UDP	uridine 5’-diphosphate
UTP	uridine 5’-triphosphate
UV	ultra violet
VCF	voltage-clamp fluorometry
VEGF	vascular endothelial growth factor
VNUT	vesicular nucleotide transporter
VRAC	volume-regulated anion channel
WT	wild type
YFP	yellow fluorescent protein
YO-PRO1	Diiodure de 4-[(3-méthyl-1,3-benzoxazol-2(3H)-ylidène)méthyl]-1-[3-(triméthyl ammonio)propyl]quinoléinium
ZAC	canal activé par le zinc
α,βmeATP	α,β-méthylène adénosine 5‘-triphosphate
β,γmeATP	β,γ-méthylène adénosine 5‘-triphosphate

LISTE DES TABLES ET FIGURES

Chapitre 1

Figure 1.1 : les divers modes de communication intercellulaire.

Figure 1.2 : Classification des récepteurs membranaires.

Figure 1.3 : les grands systèmes de transports ionique à travers la membrane plasmique.

Figure 1.4 : Principe du patch-clamp.

Figure 1.5 : Les membres de la famille des Ligand-Gated Ion Channel (LGICs).

Figure 1.6 : La signalisation purinergique.

Figure 1.7 : Mécanismes de libération de l'ATP extracellulaire.

Figure 1.8 : Mécanismes de dégradation de l'ATP extracellulaire.

Table 1.1 : Localisation et fonctions des différents sous-types de récepteurs P2Xs.

Figure 1.9 : Profils d'activation et de désensibilisation des différents sous-types de récepteurs rP2Xs.

Figure 1.10 : Rôle des récepteurs P2X1 sur les plaquettes et les neutrophiles dans la formation du thrombus.

Figure 1.11 : Régulation du trafic des récepteurs AMPA dans l'hippocampe.

Figure 1.12 : Nociception et douleur neuropathique.

Table 1.2 : Pharmacologie des récepteurs P2Xs.

Chapitre 2

Figure 2.1 : Architecture du récepteur P2X4.

Figure 2.2 : Substitued cysteine accessibility method (SCAM).

Figure 2.3 : Le pore transmembranaire.

Figure 2.4: Les vestibules et le pore transmembranaire.

Figure 2.5 : Réarrangements structuraux lors du phénomène de gating.

Figure 2.6 : Mouvements des feuillets au sein du corps du récepteur.

Figure 2.7 : Mouvements des domaines transmembranaires.

Figure 2.8 : Modèle amélioré de l'état ouvert par Heymann et al.

Figure 2.9 : Modèle allostérique MWC appliqué à un récepteur trimérique à trois sites de liaison.

Figure 2.10 : Modèle séquentiel KNF appliqué à un récepteur trimérique à trois sites de liaison.

Figure 2.11 : L'état dilaté.

Figure 2.12 : Le phénomène de flickering.

Figure 2.13 : Modèles cinétiques du fonctionnement allostérique des récepteurs P2Xs.

Chapitre 3

Figure 3.1: Isomérisation de l'azobenzène.

Figure 3.2: Les 4 mécanismes d'isomérisation de l'azobenzène.

Figure 3.3 : Dérivé d'azobenzène ponté en C2.

Figure 3.4 : Les outils photochimiques utilisés en pharmacologie.

Figure 3.5 : Les principaux PCLs développés sur les LGICs et les canaux potassiques.

Figure 3.6 : Principe d'utilisation du QAQ comme PCL.

Figure 3.7 : Les principaux PTLs développés sur les LGICs et les canaux potassiques.

Figure 3.8 : Stratégie PTL appliquée à un récepteur glutamatergique.

Figure 3.9 : Utilisation du MAG pour l'étude de la désensibilisation des récepteurs iGluR.

Figure 3.11 : Exemple d'un crosslinker photoswitchable sur une chaîne polypeptidique.

Figure 3.12 : Photorégulation de l'activité du facteur de transcription AP1.

Résultats

Figure 4.1 : Stratégie de photorégulation du récepteur P2X.

Table 4.1 : Composition des solutions utilisées pour les mesures de perméabilité.

Figure 4.2 : Optogating et optoblocking.

Figure 4.3 : Bistabilité du récepteur photorégulé.

Figure 4.4 : Influence de la taille et de la charge de la molécule sur l'optogating.

Figure 4.5 : Photocontrôle de l'activité synaptique par LiP2X2R.

Figure 4.6 : Expression en surface des constructions concatémères I328C rP2X2-3T.

Figure 4.7 : Etude de l'optogating.

Figure 4.8 : Etude de l'optoblocking.

Figure 4.9 : Crosslinkers photoclivables.

Table 4.2 : Paires de résidus ciblées pour le criblage des composés photoclivables.

Figure 4.10 : Principe de la stratégie des sondes moléculaires.

Figure 4.11 : Caractérisation du MAM.

Table 4.3 : Distances entre les C_β des résidus choisis pour les criblages.

Figure 4.12 : Criblage horizontal extracellulaire de la série 1.

Figure 4.13 : Spécificité du double pontage par le MAM et caractérisation des courants photoinduits.

Figure 4.14 : Profil de photorégulation du mutant I328C rP2X2-3T.

Figure 4.15 : Caractérisation unitaire du récepteur I328C photorégulé par le MAM.

Figure 4.16 : Exploration des répercussions de l'ouverture photoinduite sur le site de liaison de l'ATP et sur le gating du mutant I328C rP2X2-3T.

Figure 4.17 : Criblage horizontal de la partie intracellulaire.

Figure 4.18 : Criblage vertical de la partie transmembranaire.

Figure 4.19 : Enregistrements en single-channel sur le mutant I328C/S345C marqué par le MAM.

Table 4.4 : Tableau comparatif des distances mesurées sur les structures cristallographiques et sur le modèle produit par dynamique moléculaire.

Figure 4.20 : Répercussions du mouvement photoinduit sur le site de liaison de l'ATP.

Figure 4.21 : Stoechiométrie d'activation par le MAM.

Figure 4.22 : Dynamique moléculaire du récepteur zfP2X4 ponté par le MAM.

Figure 4.23 : Réarrangement des segments transmembranaires au cours de l'activation du récepteur P2X.

Figure 4.24 : Structures chimiques du BMA et du MAM fixés à la protéine et distances S-S des isomères *cis* et *trans*.

Figure 4.25 : Le mouvement de fermeture de la mâchoire est-il associé à la flexion de TM2 ?

Figure 4.26 : Caractéristiques électrophysiologiques des hétéromères P2X2/3.

Figure 4.27 : Stratégie utilisant les cotransfections de sous-types P2X2 et P2X3.

Figure 4.28 : Caractérisation de la réponse à l'α,β-meATP des hétérotrimères rP2X2/rP2X3.

Figure 4.29 : Caractérisation de la réponse ATP des concatémères K69A/G342P rP2X2.

Figure 4.30 : Le zinc est un agoniste du mutant G342P.

Figure 4.31 : Exploration cinétique du mutant I328C marqué par le MAM.

Figure 4.32 : Etude du phénomène d'inactivation.

INTRODUCTION

Chapitre 1 : Aspects physiologiques des récepteurs P2Xs

1. Généralités sur les récepteurs membranaires et les canaux ioniques

1.1. Généralités sur les récepteurs membranaires

La survie et le maintien de l'intégrité de tout organisme vivant dépendent de sa capacité à intégrer les informations reçues et à mettre en place une réponse cellulaire adaptée aux stimuli. Les cellules doivent certes communiquer entre elles, mais également avec leur environnement. La notion de messager chimique transmettant l'information a été introduite pour la première fois par les travaux de Claude Bernard sur le curare en 1856 (Bernard, 1856), et le concept de récepteur développé à la fois par Paul Ehrlich, qui s'est intéressé à l'affinité spécifique de certains colorants pour certains constituants cellulaires (Erhlich, 1913) et par John Newport Langley avec des travaux portant sur l'action salivaire de deux alcaloïdes (Langley, 1905). Depuis ces travaux pionniers, il a fallu attendre les années 1970s pour obtenir la preuve formelle de l'existence de ces molécules réceptrices avec la première purification d'un récepteur cholinergique lié à la bungarotoxine par Changeux (Changeux et al., 1970). Divers modes de communication intercellulaire ont depuis été identifiés (Figure 1.1) : endocrine via des molécules telles que les hormones acheminées par

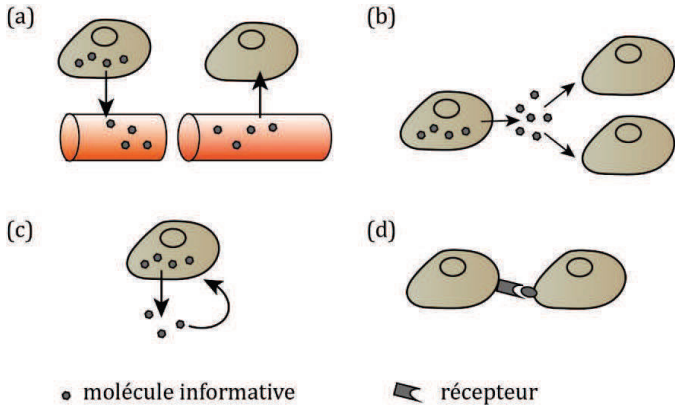


Figure 1.1 : Les divers modes de communication intercellulaire. (a) transmission endocrine, l'information est transmise via la circulation sanguine (b) transmission paracrine, les cellules émettrices et réceptrices sont voisines, les molécules sont libérées dans l'espace intercellulaire (c) transmission autocrine par sécrétion de médiateurs chimiques locaux (d) transmission contact-dépendante, les molécules restent fixées à la surface de la membrane plasmique, la reconnaissance s'effectue par les récepteurs de la cellule cible (adapté de Maillet 2006).

le système circulatoire, paracrine entre cellules voisines dont fait partie la signalisation synaptique, contact-dépendante lorsque les molécules de signalisation restent fixées à la surface de la membrane plasmique, ou autocrine si le signal est reçu par la cellule émettrice. Les récepteurs membranaires, définis comme des macromolécules impliquées de manière spécifique et directe dans la transmission d'un signal inter- et/ou intracellulaire, sont classés en fonction de leur nature en quatre sous-groupes (Figure 1.2) : les récepteurs métabotropiques à sept hélices transmembranaires couplés aux protéines G, les récepteurs ionotropiques formant un pore à travers la membrane, les récepteurs à activité enzymatique intrinsèque (par exemple les récepteurs à activité tyrosine-kinase) ou non (notamment les récepteurs des cytokines) et les autres. On estime que 27% du génome humain code pour

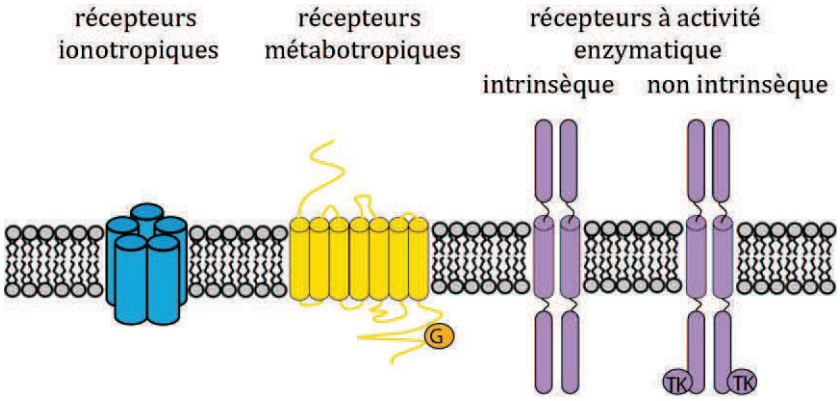


Figure 1.2 : Classification des récepteurs membranaires. Parmi les récepteurs membranaires, on distingue quatre sous-groupes qui sont tous activés par la fixation d'un ligand dans leur domaine extracellulaire. Les récepteurs canaux appelés aussi LGICs forment des pores à travers la membrane. Les récepteurs métabotropiques à 7 hélices transmembranaires sont subdivisés en trois sous groupes I-II-III et activent, par l'intermédiaire de la protéine G, une voie enzymatique ou un canal ionique. Les récepteurs à activité enzymatique existent sous forme dimérique lorsqu'ils sont activés par la fixation du ligand et regroupent : les récepteurs à activité enzymatique intrinsèque telles que les tyrosine-kinase (TKR) dont l'activité catalytique est portée par le segment intracellulaire membranaire et les récepteurs des cytokines qui fonctionnent en collaboration avec des tyrosines kinases non réceptrices intracellulaires. Le dernier groupe est formé par les autres récepteurs qui n'entrent pas dans la classification (adapté de Maillet 2006).

des protéines membranaires dont plus de 20% pour des récepteurs membranaires (Almén et al., 2009). La fixation du ligand sur son récepteur modifie sa conformation, ce qui lui permet de transmettre le signal à travers la membrane plasmique, structure organisée et complexe séparant le milieu intracellulaire du milieu environnant. La réponse cellulaire à la fixation du ligand peut être de nature métabolique, impliquant alors toute une cascade de signalisation avec recrutement de nombreuses molécules effectrices intermédiaires, ou de nature

électrique par changement de la composition ionique du milieu intracellulaire et donc modification de la polarisation de la membrane plasmique.

1.2. Le concept de canaux ioniques

Parmi les différents types de transports perméatifs (Figure 1.3), celui assuré par les canaux ioniques s'effectue de manière passive, c'est-à dire dans le sens du gradient électrochimique sans apport d'énergie. Il existe de nombreux types de canaux ioniques participant, notamment, à trois fonctions cellulaires fondamentales qui sont, outre la transduction de signaux, la régulation de l'osmolarité cellulaire et le contrôle du potentiel membranaire. Ils se différencient par leur durée d'ouverture (permanente, transitoire rapide ou lente) et leur sélectivité aux différents ions. L'ouverture du canal à travers la membrane est médiée par des stimuli d'origines variées, qu'ils soient physiques comme un changement de potentiel membranaire (canaux voltage dépendants), une augmentation de la température (canaux thermo-sensibles), l'absorption d'un photon (canaux photosensibles) ou un étirement mécanique (canaux mécano-sensibles), ou chimiques. Ils sont impliqués dans de nombreux phénomènes biologiques nécessitant des changements rapides de la composition cellulaire comme la contraction de cellules cardiaques, la conduction du potentiel d'action, le transport de nutriment ou l'activation plaquettaire.

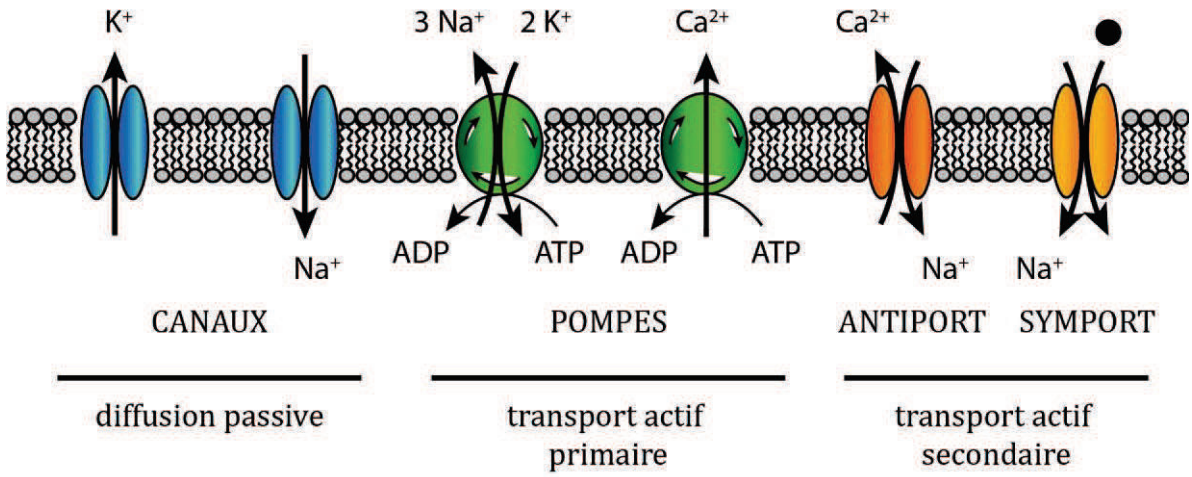


Figure 1.3 : Les grands systèmes de transports ionique à travers la membrane plasmique. La diffusion passive par le biais de canaux s'effectue dans le sens du gradient électrochimique et ne nécessite pas d'énergie. Le transport actif primaire est assuré par des pompes qui sont des enzymes transmembranaires. Il nécessite l'hydrolyse de l'ATP. Le transport des ions s'effectue contre le gradient de concentration. Le transport actif secondaire est assuré par des symports et des antiports : ils transportent simultanément deux substances en tirant profit de l'énergie d'un transport passif (adapté de Landry et Gies 2014).

Si l'importance des ions dans l'excitabilité des cellules nerveuses et musculaires est connue depuis les travaux de Sidney Ringer dans les années 1880s qui prouvèrent la nécessité de perfuser les organes isolés tels que le cœur avec des solutions contenant des concentrations précises en ions sodium, potassium et calcium afin de les garder fonctionnels (Ringer, 1882), le concept d'entité protéique favorisant le passage de la membrane plasmique mis du temps à s'imposer. Les travaux de Nernst sur la diffusion des électrolytes inspirèrent tout d'abord l'hypothèse d'une origine ionique du potentiel bioélectrique (Behrends, 2012) observé, mais ce sont les travaux de Bernstein, au début des années 1900s, qui permirent une avancée majeure en proposant un premier modèle appelé « Théorie Membranaire », où la perméabilité des cellules excitables varie suivant l'état bioélectrique dans lequel elles se trouvent : dans leur état de repos, elles possèdent une perméabilité potassique et la perméabilité aux autres ions augmente lors de l'excitation (Seyfarth, 2006). En 1905, Höber corrobora cette hypothèse en observant l'effet d'une augmentation de la concentration extracellulaire des ions potassiques sur le potentiel de repos des cellules (Höber, 1905), mais il a fallu attendre une cinquantaine d'années avec les travaux de Hodgkin et Huxley pour obtenir la première description du mécanisme de propagation du potentiel d'action sur un axone de calamar (Hodgkin and Huxley, 1945; Hodgkin et al., 1952). Le concept de canal ionique ne s'est pourtant imposé qu'au cours des années 1970s, suite aux travaux de Hille et Armstrong qui étudiaient l'effet de toxines sur la conductance sodique et calcique (Armstrong, 1971; Armstrong and Binstock, 1965; Hille, 1968) et leur existence a été confirmée par Katz et Miledi lors de l'analyse des variations du potentiel d'action induit par l'acétylcholine sur des cellules musculaires (Katz and Miledi, 1970). Le développement de la technique de patch-clamp par Neher et Sakmann en 1976 (Figure 1.4), permettant la détection des transitions entre état ouvert et fermé de ces protéines (Neher and Sakmann, 1976), a alors lancé l'étude fonctionnelle des canaux ioniques. Par la suite, les premiers canaux ioniques ont été clonés dans les années 1980s (Boulter et al., 1986; Noda et al., 1984; Sumikawa et al., 1982), marquant le début d'une compréhension du fonctionnement des ces protéines à un niveau moléculaire, tout comme la résolution de la première structure cristallographique par l'équipe de MacKinnon en 1998 (Doyle et al., 1998). Dès lors, l'étude structurale couplée aux différentes études fonctionnelles a permis l'exploration de la diversité de ces canaux et la compréhension de mécanismes de gating, de

perméation ou de modulation allostérique, phénomènes que je décrirai par la suite, à un niveau moléculaire.

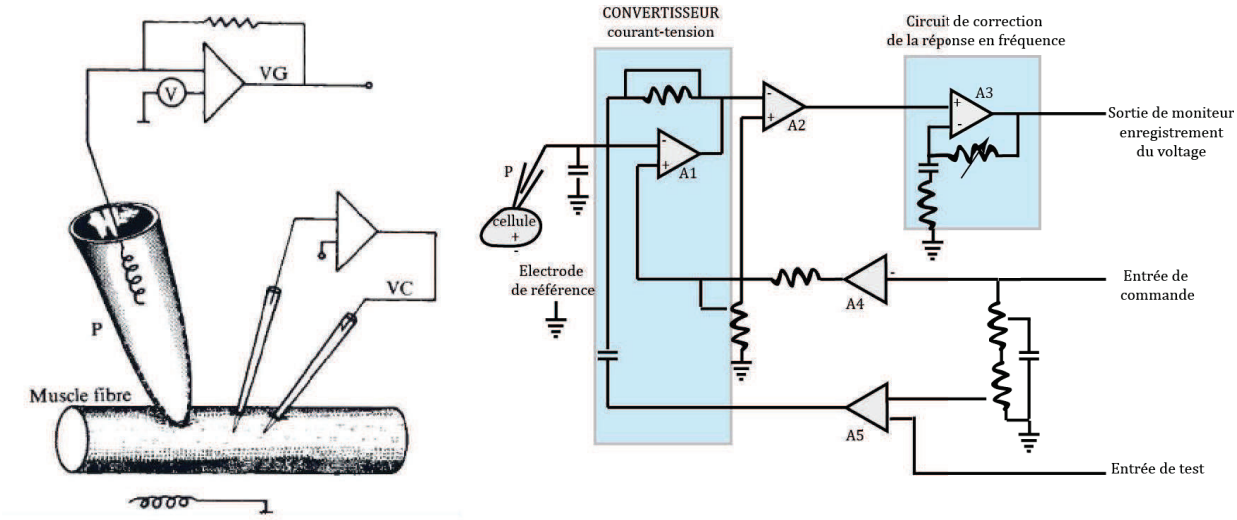


Figure 1.4 : Principe du patch-clamp. (a) Patch-clamp développé par Neher et Sakmann. Schéma du dispositif utilisé pour enregistrer les courants transitant à travers un récepteur à l'acétylcholine de la membrane de fibres musculaires squelettiques de grenouille. La pipette (P) a un diamètre de 3-5µm. VC permet d'imposer un potentiel membranaire. VG mesure les courants. (b) Diagramme du principe du patch-clamp à une électrode. A2, A5 et A3 sont des amplificateurs opérationnels (Neher and Sakmann, 1976 et Hamill et al., 1981).

1.3. Description générale des LGICs

Les récepteurs canaux, appelés LGICs (Ligand-Gated Ion Channel) sont des canaux ioniques dont l'ouverture est médiée par la liaison d'un ligand dans leur partie extracellulaire. Ils associent donc les deux caractéristiques des protéines décrites précédemment. Le phénomène allant de la liaison de l'agoniste dans son site à l'ouverture du canal est appelé « gating » et aboutit à une dépolarisation ou une hyperpolarisation membranaire à une échelle de temps très rapide, de l'ordre de la milliseconde. Ils sont impliqués dans des phénomènes physiologiques majeurs, notamment dans la transmission de l'influx nerveux tant au niveau central que périphérique.

La classification de ces récepteurs est basée sur la stœchiométrie d'assemblage des différentes sous-unités (Figure 1.5). Trois superfamilles ont ainsi été définies : les récepteurs pentamériques, les récepteurs tétramériques et les récepteurs trimériques. De plus, on les distingue par la nature de leur ligand endogène. Si chacune de ces familles possède ses

propres caractéristiques, on peut relever certains éléments communs au niveau de leur organisation générale : ces récepteurs sont multimériques, chaque sous-unité participant à la formation du pore transmembranaire, et le domaine extracellulaire contient le site de liaison du ligand. Enfin, chacun de ces récepteurs possède différentes sous-unités qui s'assemblent avec une combinatoire très complexe expliquant la grande diversité fonctionnelle des membres de cette super famille.

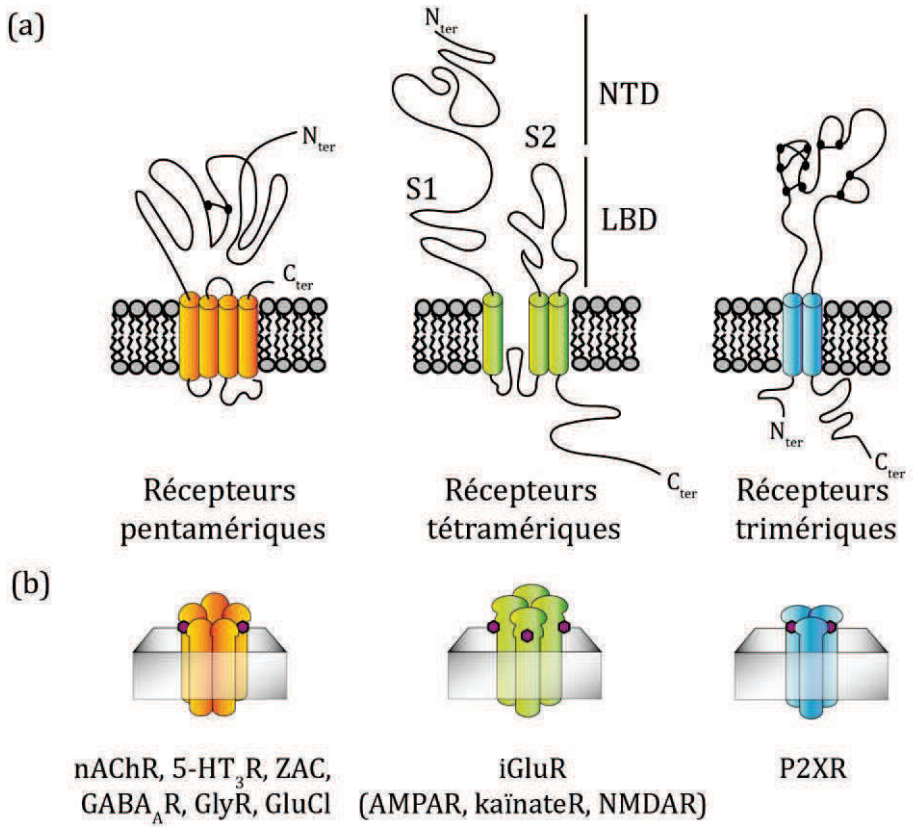


Figure 1.5 : Les membres de la famille des Ligand-Gated Ion Channel (LGICs). Représentation schématique des trois familles de LGICs. (a) représentation d'une sous-unité, les résidus cystéines engagés dans un pont di-sulfure sont représentés par des cercles noirs, NTD est le domaine régulateur des iGluRs, LBD le domaine de fixation du ligand des iGluRs formé par les lobes S1 et S2 (b) représentaion de l'oligomère, le ligand est représenté par un polygone violet. Les récepteurs pentamériques peuvent lier de 2 à 5 ligands selon le sous-type, les iGluRs 4 ligands et les P2XRs 3 (adapté de Lemoine et al., 2012).

1.3.1. Les récepteurs pentamériques

La famille des récepteurs pentamériques, également appelée « cys-loop » chez les eucaryotes en raison de la présence d'un pont disulfure intra-sous-unité dans le domaine extracellulaire formant une boucle de 13 acides aminés, comprend à la fois des récepteurs cations-sélectifs dits excitateurs tels que les récepteurs nicotiniques (nAChR), les récepteurs sérotoninergiques (5-HT_3) et les canaux activés par le zinc (ZAC) et des récepteurs anions-

sélectifs dits inhibiteurs tels que les récepteurs GABAergiques ($GABA_AR$), les canaux chlore activés par le glutamate (GluCl) et les récepteurs de la glycine (GlyR) (Miller and Smart, 2010). Chaque sous-unité est constituée de quatre segments transmembranaires organisés en hélices α avec des extrémités N- et C- terminales extracellulaires. Le site de liaison du ligand, appelé site orthostérique, est situé à l'interface entre deux sous-unités adjacentes, formé par les longs domaines N-terminaux organisés en feuillets β. Le pore est quant à lui formé par l'association de cinq segments M2. L'association des différentes sous-unités suit des lois d'assemblage strictes (Corringer et al., 2000; Smart and Paoletti, 2012). Le domaine intracellulaire est, lui, variable en taille et en séquence. Ces récepteurs pentamériques sont apparus très tôt dans l'évolution puisqu'on les trouve à la fois chez les procaryotes (Tasneem et al., 2004), que ce soit dans des eubactéries ou des archaebactéries, et chez les eucaryotes vertébrés (Le Novère et al., 2002) et invertébrés (Jones et al., 2007). Ils n'ont pour l'instant pas été identifiés chez les plantes ou les champignons. Ils sont impliqués dans de très nombreux processus neuronaux chez les vertébrés, dans la locomotion chez les invertébrés et dans le chimiotactisme chez les procaryotes, mais nombre de leurs fonctions restent encore inconnues, en particulier chez les organismes primitifs.

1.3.2. Les récepteurs tétramériques

La seconde famille des LGICs comprend uniquement les récepteurs excitateurs ionotropiques du glutamate. On y distingue 4 sous-familles nommées en fonction de l'agoniste sélectif de référence : les récepteurs NMDA (GluN1, GluN2A-D, GluN3A-B) qui nécessitent la présence de la glycine comme co-agoniste, les récepteurs AMPA (GluA1-4), les récepteurs kaïnate (GluK1-5) et les récepteurs orphelins delta (GluD1-2) (Mayer, 2005a). L'architecture de ces différents récepteurs est particulière, le large domaine extracellulaire est subdivisé en deux lobes repliés en module « Venus FlyTrap » et on y distingue un domaine régulateur formé par l'extrémité N-terminale d'environ 40kDa (NTD) impliqué dans l'assemblage et la modulation allostérique, suivi d'un domaine de fixation du ligand de 30kDa (LBD) constitué de deux lobes (S1 et S2) reliés par une charnière flexible. Le domaine transmembranaire est formé quant à lui par trois hélices α (M1, M3-4) et d'une boucle intracellulaire réentrante (M2). Le canal est formé par l'hélice M3 et la boucle M2 alors que M1 et M4 servent d'interface entre les sous-unités (Sobolevsky et al., 2009). L'efficacité des

agonistes est corrélée au degré de fermeture du LBD et le phénomène de désensibilisation est médié par un réarrangement de l'interface des LBDs (Reiner and Isacoff, 2014). La signalisation glutamatergique ionotropique a tout d'abord été étudiée chez les mammifères, avant la découverte de récepteurs homologues chez les plantes (*Arabidopsis thaliana*) (Lam et al., 1998) puis chez une cyanobactérie (*Cyanobacterium synechocystis*) (Davenport, 2002).

1.3.3. Les récepteurs trimériques

Enfin, les récepteurs purinergiques (P2X1-7), activés par l'ATP, constituent la troisième famille des LGICs. Ils résultent de l'oligomérisation de trois sous-unités identiques (homotrimère) ou homologues (hétérotrimère), chacune possédant deux segments transmembranaires unis par un large domaine extracellulaire glycosylé. Des deux hélices transmembranaires (TM1 et TM2), seule l'hélice TM2 forme le pore. Ils sont considérés comme cations non-sélectifs c'est-à-dire perméants aux ions calciques, sodiques et potassiques. Le domaine extracellulaire, riche en ponts di-sulfures, contient le site de liaison de l'ATP formé à l'interface entre deux sous-unités. Les extrémités N- et C-terminales sont de longueur variable selon les sous-types : si l'extrémité N-terminale est d'une longueur plutôt constante (20-30 résidus), la taille de l'extrémité C-terminale est quant à elle beaucoup plus variable (28 acides aminés sur P2X6, 242 sur P2X7). Les récepteurs P2Xs ont d'abord été identifiés chez les vertébrés (North, 2002), puis des homologues ont été trouvés chez un tématode *Schistostoma mansoni*, (Agboh et al., 2004) une amibe unicelllaire *Dictyostelium discodeum* (Fountain et al., 2007) et une algue verte *Ostreococcus tauri* (Fountain et al., 2008) et récemment chez un arthropode (*Boophilus micoplus*) (Bavan et al., 2011). Il semblerait que l'évolution de cette famille soit tardive et que ses membres ne dérivent pas d'un ancêtre procaryote.

2. Les récepteurs P2Xs

Du fait de l'identification moléculaire relativement tardive de cette famille de récepteurs (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994), les données les concernant sont moins complètes que pour les autres familles. Il est apparu rapidement qu'ils étaient impliqués dans de très nombreuses voies physiologiques et l'intérêt porté à ces récepteurs n'en a été

que plus vif. Nous allons ainsi explorer dans ce chapitre pourquoi ils sont devenus une cible thérapeutique potentielle majeure.

2.1. La signalisation purinergique : origine et dégradation de l'ATP extracellulaire

L'ATP est un nucléotide de la famille des purines à haut potentiel énergétique dont le rôle dans la physiologie cellulaire est crucial. Outre sa place centrale dans le métabolisme, de par sa capacité de transfert d'énergie par hydrolyse successive des ses fonctions phosphate, connue depuis les années 1940s (Drury and Szent-Györgyi, 1929; Green and Stoner, 1950), ainsi que son importance dans la plupart des réactions de biosynthèses intracellulaires et dans le transport de molécules (Gibson, 1982), l'ATP est impliquée dans des processus de signalisation, tant intra- qu'extracellulaires et joue donc un rôle fondamental dans la communication intercellulaire. Sa fonction de neurotransmetteur, suggérée en 1959 par Holton lorsqu'il montra que la libération d'ATP par des branches collatérales de fibres sensitives afférentes entraînait une vasodilatation locale (Holton, 1959), ne fut défendue qu'à partir de 1972 par Burnstock qui émit l'hypothèse que l'ATP était responsable de la transmission non-cholinergique non-adrénergique sur les cellules musculaires lisses du tractus gastro-intestinal (Burnstock, 2014; Burnstock et al., 1970). Longtemps sceptique vis-à-vis de ce concept, la communauté scientifique étudie maintenant depuis une trentaine d'années cette signalisation et deux types de récepteurs ont été identifiés : des récepteurs métabotropiques appelés P2Y et des récepteurs canaux P2Xs (Fredholm et al., 1994) (Figure 1.6).

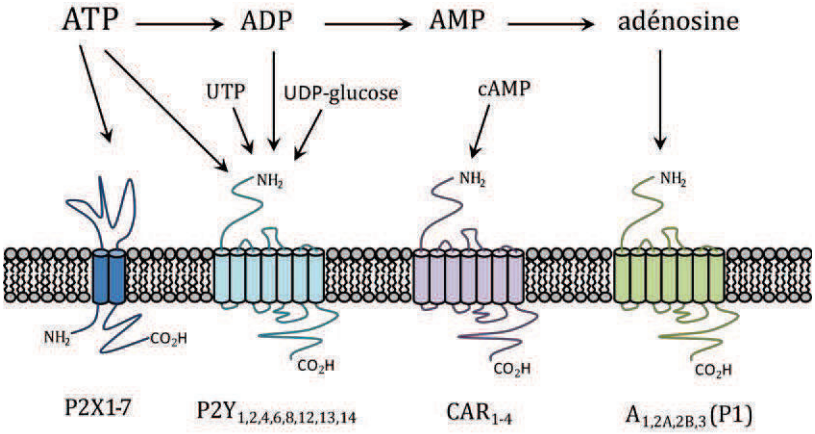


Figure 1.6 : La signalisation purinergique. Représentation schématique de la dégradation séquentielle de l'ATP et des récepteurs membranaires aux nucléotides et nucléosides impliqués dans la voie de signalisation purinergique. L'ATP et l'ADP se lient sur les récepteurs P2 alors que l'adénosine se lie sur les récepteurs de type P1. Les récepteurs CAR à 7 segments transmembranaires de *Dictyostelium* forment une famille liant le cAMP (adapté de Khakh and North, 2006).

L'ATP cytosolique, présent à des concentrations de l'ordre du millimolaire dans tous les types cellulaires, constitue la source principale d'ATP extracellulaire. Du fait de sa taille et de sa charge, l'ATP ne peut traverser la membrane par simple perméabilité, on a donc considéré pendant longtemps qu'elle était relarguée par des cellules endommagées dans le milieu extracellulaire par simple lyse de la membrane et diffusion. Par ailleurs, de nombreux travaux ont pu montrer que l'ATP intracellulaire est stockée également dans des vésicules sécrétoires, que se soit dans des tissus exocrines ou neuroendocrines (Lazarowski et al., 2011). L'exocytose de ces granules calcium-médiée dépend d'interactions avec le cytosquelette et est régulée par des protéines de la famille SNARE. L'accumulation de l'ATP dans ces granules est permise par un transporteur VNUT à douze hélices transmembranaires appelé SLC17A9 (Lazarowski, 2012) (Figure 1.7). Différents types de stimuli sont susceptibles de déclencher l'exocytose, qu'ils soient physiques, passant le canal TRPV4 (Mihara et al., 2011), ou chimiques comme la stimulation cholinergique. Plus récemment, d'autres mécanismes de libération de l'ATP ont été proposés, impliquant des transporteurs de type protéine ABC (Cantiello, 2001, Tu et al., 2010), des hémi-canaux de la famille des connexines (De Vuyst et al., 2009) et la pannexine-1 (Bao et al., 2004). D'autres hypothèses proposant un rôle des canaux anioniques VRAC (Hisadome et al., 2002) ou TTHY3 (Chen et al., 2010) sont quant à elles plus controversées. Enfin, certaines enzymes membranaires telles que les

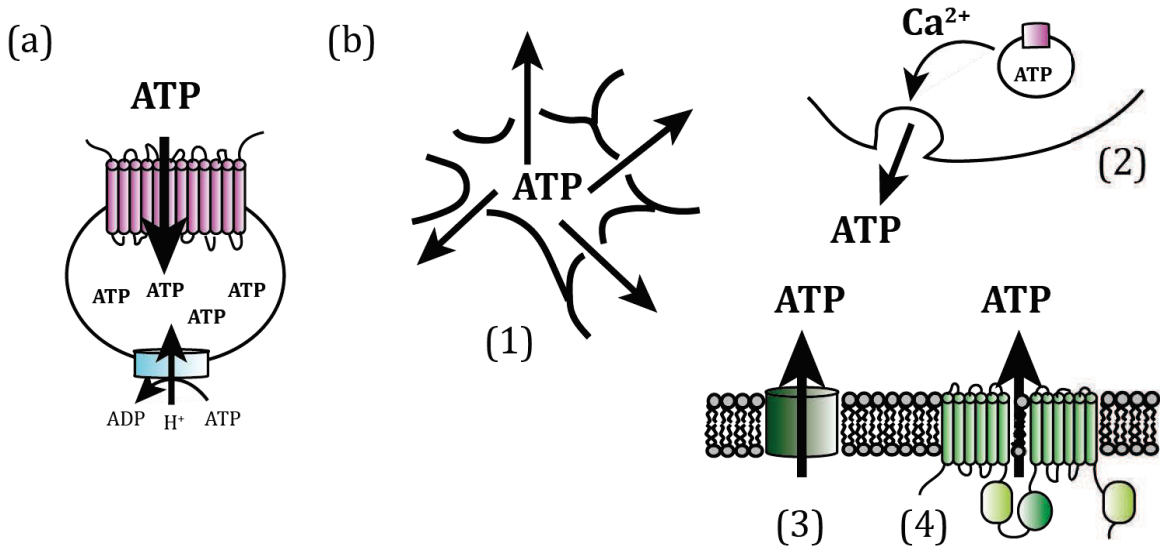


Figure 1.7 : Mécanismes de libération de l'ATP extracellulaire. (a) Vésicule de sécrétion de l'ATP. SCL17A9/VNUT transporte l'ATP dans la lumière des granules de sécrétion grâce au gradient électrochimique généré par la pompe à proton sensible à la bafilomycine V-ATPase (b) Voies de libération de l'ATP dans le milieu extracellulaire. (1) suite à une lyse cellulaire (2) par exocytose calcium-médiée (3) par des canaux membranaires (4) par des transporteurs de type protéine ABC (adapté de Burnstock et Verkhratsky, 2009, Lazarowski, 2012).

ecto-adénylate kinases ou les nucléosides diphosphokinases (NDPK) permettent la conversion d'ADP en ATP.

L'effet physiologique de l'ATP extracellulaire est modulé par la présence d'enzymes spécifiques de dégradation ou d'interconversion des nucléotides et sa demi-vie dans l'espace extracellulaire est, de par leur existence, très courte (0,2s dans le sang). Quatre types d'enzymes hydrolytiques ont été identifiés dans le milieu interstitiel et/ou à la surface cellulaire : des ectonucléosides triphosphates diphosphohydrolases (E-NTPDase), des ectonucléotides pyrophosphatases/phosphodiesterases (E-NPPase), l'ecto-5'-nucléotidase et les phosphatases alcalines (Figure 1.8). L'activité des ces enzymes permet la catalyse séquentielle complète du nucléoside triphosphate en nucléoside correspondant.

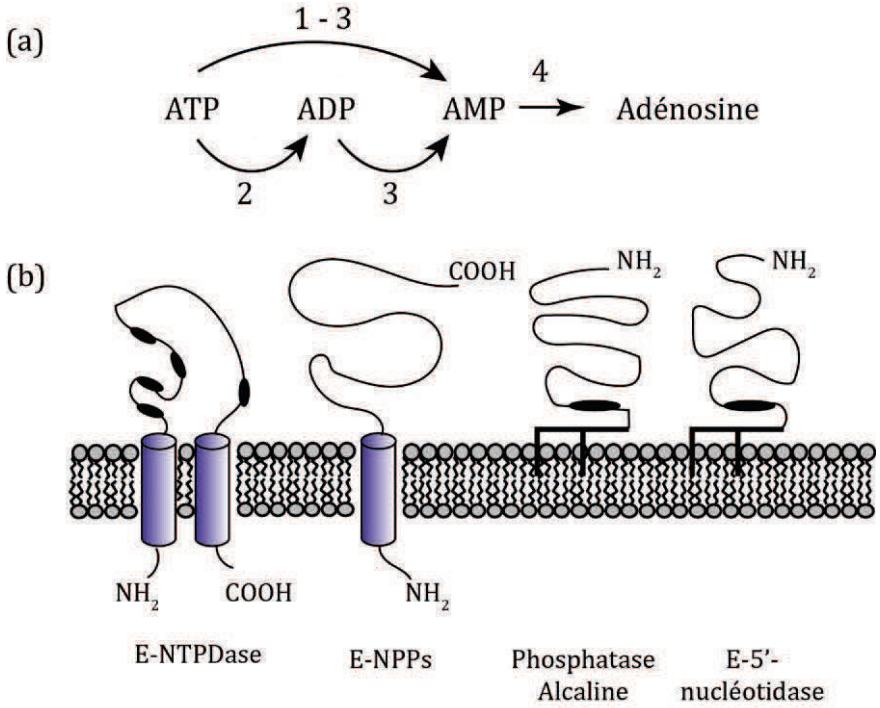


Figure 1.8 : Mécanismes de dégradation de l'ATP extracellulaire. (a) hydrolyse séquentielle de l'ATP, (1) E-NTPDase1 (2) E-NTPDase2 (3) E-NPP (4) E-5'-nucléotidase (b) représentation de la topographie des enzymes hydrolytiques (adapté de Burnstock, 2014).

Il faut noter que la présence de ces enzymes a conduit à sous-estimer la concentration d'ATP extracellulaire réelle à la surface cellulaire lors des mesures *in vitro* de chromatographies et d'analyse de milieu de culture. De nouvelles techniques plus sensibles basées sur l'utilisation de microélectrodes biosenseurs de l'ATP (Dale and Frenguelli, 2012) ou de sondes spécifiques ancrées à la membrane (Yamamoto et al., 2011) ont permis de l'estimer autour de 100 micromolaire.

2.2. Physiologie

Identifiées exclusivement chez les eucaryotes jusqu'à présent, sept différentes sous-unités présentant une homologie de séquence comprise entre 40 et 55% peuvent s'associer pour former des homo- ou des hétérotrimères (North, 2002). Chaque sous-type se distingue par sa cinétique de désensibilisation (Figure 1.9) ainsi que par sa sensibilité à différents agonistes. Exprimés de façon quasi ubiquitaire dans l'organisme (Table 1.1) que se soit sur des cellules excitables ou non, ils sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques tels que la transmission synaptique, la plasticité neuronale, l'agrégation plaquettaire, la perception de la douleur ainsi que dans des voies pathologiques telles que la pré-éclampsie, l'arthrose, la neuro-dégénération ou la douleur neuropathique (Burnstock and Kennedy, 2011). Malgré cela, les souris knock-out sont viables, suggérant la possibilité de mécanismes de compensation (Kaczmarek-Hájek et al., 2012).

L'objet de mes travaux de thèse étant une exploration au niveau moléculaire de relations structure-fonctions, le but ici n'est pas de dresser une revue exhaustive de la physio(patho)logie de ces récepteurs : je ne vais développer dans ce chapitre que quelques exemples de voies physiologiques et de processus pathologiques impliquant les récepteurs P2Xs, avec à chaque fois un exemple impliquant des cellules non-neuronales pour marquer la diversité des processus mis en jeu.

Sous-type	Principales localisations	Fonctions principales
P2X1	muscles lisses, plaquettes, cervelet, neurones de la corne dorsale de la moelle épinière	contraction des muscles lisses, activation plaquettaire
P2X2	muscles lisses, neurones du SNC, rétine, cellules chromaffines, glandes autonomes et sensorielles	nociception, transmission sensorielle, régulation de la libération de neurotransmitteurs
P2X3	neurones sensitifs, neurones du tractus solitaire, quelques neurones sympathiques	régulation de la plasticité synaptique, nociception, transmission sensorielle
P2X4	neurones du SNC, testicules, colon	modulation de la douleur chronique, tonus vasculaire, modulation de l'inflammation
P2X5	cellules en prolifération de la peau, de l'intestin, de la vessie, du thymus, de la moelle épinière	inhibition de la prolifération cellulaire, augmentaion de la différenciation cellulaire
P2X6 (hétéromère)	neurones du SNC, motoneurones de la moelle épinière	sécrétion glandulaire
P2X7	cellules apoptotiques du système immunitaire, du pancréas, de la peau, ostéoclastes, ostéoblastes	prolifération cellulaire, libération de cytokines, apoptose, métabolisme osseux

Table 1.1 : Localisation et fonctions des différents sous-types de récepteurs P2Xs (adapté de Burnstock, 2014).

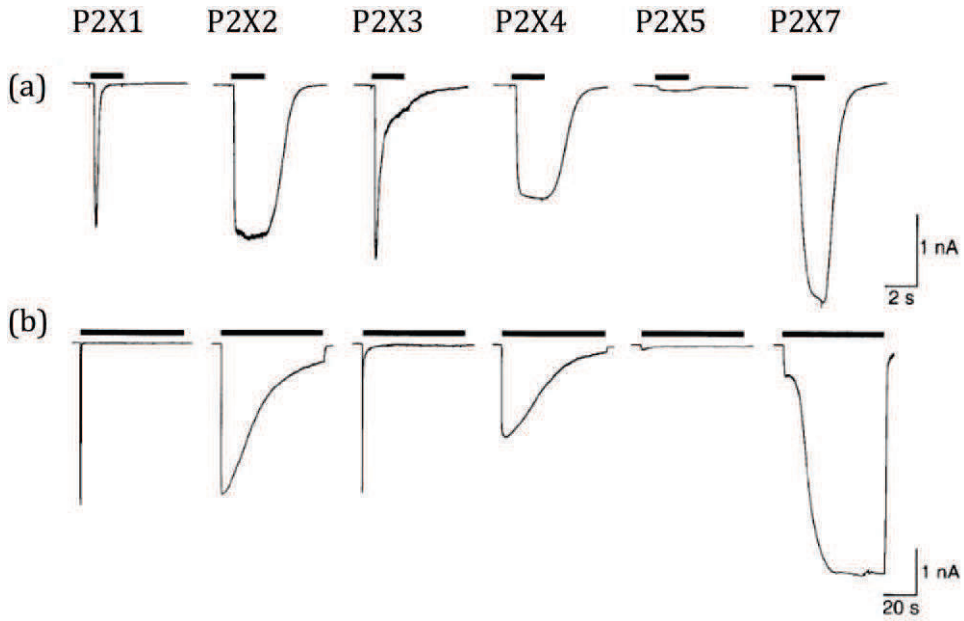


Figure 1.9 : Profils d'activation et de désensibilisation des différents sous-types de récepteurs rP2Xs. Les enregistrements électrophysiologiques d'une désensibilisation rapide et lente montrent deux profils de récepteurs. (a) Application courte d'ATP (2s, 30 µM sauf pour rP2X7 1mM) sur des cellules HEK-293 transfectées avec 1µg/mL d'ADN. Seuls les sous-types P2X1 et P2X3 désensibilisent rapidement. (b) Application longue d'ATP (60s 30 µM sauf pour rP2X7 1mM) (adapté de North, 2002).

2.2.1. Le contrôle de la formation du thrombus

Abordons tout d'abord le rôle des récepteurs P2Xs dans l'hémostase, processus qui a pour but de permettre l'arrêt du saignement lors d'une rupture vasculaire. Les plaquettes sanguines, cellules disquoïdes anucléées issues des mégacaryocytes, en sont un des acteurs majeurs. Elles ont la propriété de s'activer rapidement au contact d'une paroi vasculaire lésée, phénomène marqué par un changement de forme avec émission de longs filopodes et par une sécrétion du contenu de leurs granules. Cette phase de l'hémostase primaire a pour effet de recruter d'autres plaquettes et de produire de la fibrine pour former le clou hémostatique. Un criblage par PCR quantitative a pu montrer la présence de récepteurs P2X1 sous une forme homomérique uniquement, à la surface des plaquettes (Wang et al., 2003). Afin d'étudier leur rôle, des études sur des souris déficientes en ce sous-type (P2X1-/-) ont été conduites mais elles ont montré une conservation du processus d'hémostase dans la mesure où le temps de saignement n'était pas prolongé par rapport à celui des souris WT. Ces souris présentaient cependant une résistance au thromboembolisme systémique induit par une injection de collagène et d'adrénaline (Hechler et al., 2003). De plus, l'application d'un antagoniste sélectif de P2X1 (NF449) a

montré un effet inhibiteur sur les thromboses *in vivo* (Hechler et al., 2005). Ces résultats indiquent une contribution de P2X1 non essentielle dans la formation du thrombus, suggérant un rôle dans la régulation du phénomène. Des études de perméabilité ont d'autre part pu montrer que le flux calcique représente 10% du flux ionique total transitant par le sous-type P2X1 (Egan, 2004). Ces canaux sont donc capables d'induire un influx de calcium important, phénomène qui provoque, d'une part, une dépolarisation et d'autre part, l'activation de voies calcium-médiées intracellulaires. Dans les plaquettes, ces deux événements contribuent à leur activation. La dépolarisation induit une activation des récepteurs métabotropiques P2Y1 couplés à Gq, activant la voie de signalisation de l'IP3 qui aboutit à la libération de calcium à partir du système tubulaire dense. L'augmentation du calcium intracellulaire permet quant à elle l'activation de la voie MLCK et dans une moindre mesure la voie ERK2, qui aboutissent toutes deux à la sécrétion granulaire et à l'étalement des cellules (Oury, 2002; Toth-Zsamboki et al., 2003). Récemment, des études ont mis en évidence la contribution très précoce des cellules neutrophiles activées dans les phénomènes de coagulation microvasculaire (Massberg et al., 2010). Or les récepteurs P2X1 sont impliqués dans le recrutement aux sites inflammatoires des cellules neutrophiles

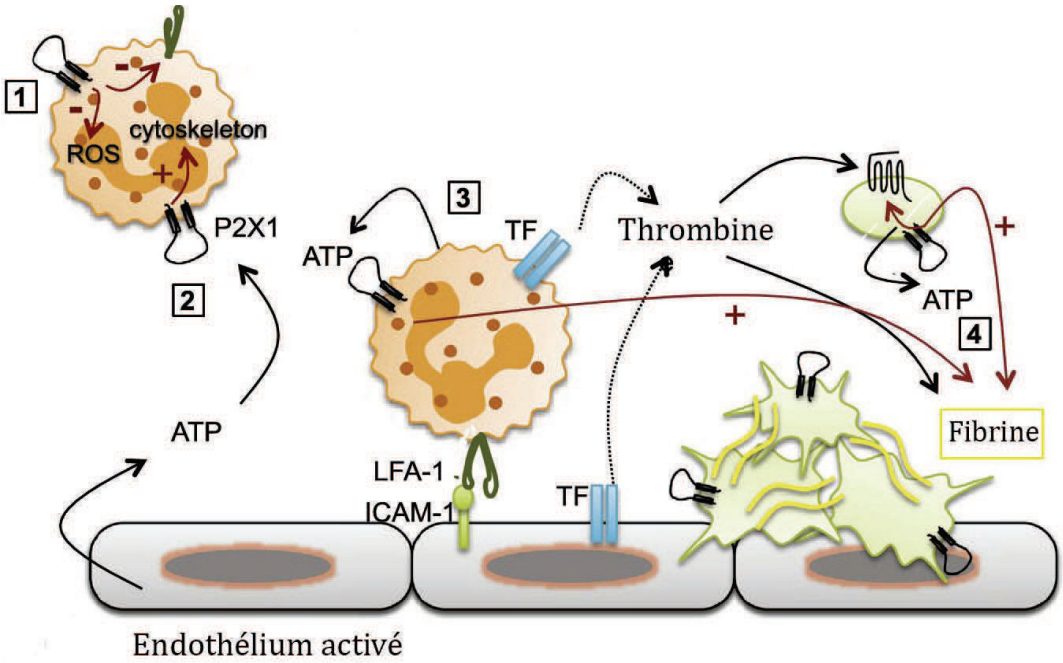


Figure 1.10 : Rôle des récepteurs P2X1 sur les plaquettes et les neutrophiles dans la formation du thrombus. L'ATP extracellulaire active les récepteurs P2X1 des neutrophiles (en orange) ce qui d'une part les maintient dans un état quiescent circulant (1), mais induit également le recrutement au site lésé (2), active les neutrophiles adhérents (3) et les plaquettes (en vert) par les voies MLCK ET ERK2 (4). ROS : espèces réactives de l'oxygène, TF : facteur tissulaire (Oury et al., 2015).

circulantes (Maitre et al., 2015) : suite à leur activation, la voie ROCK-dépendante de phosphorylation par la MLC induit une réorganisation du cytosquelette permettant le chimiotaxisme. De manière surprenante, dans un modèle d'endotoxémie, les souris déficientes en P2X1 présentent une exacerbation de la thrombocytopénie et de l'activation de la coagulation marquant la régulation négative par P2X1 de l'activation des neutrophiles (Oury et al., 2015) (Figure 1.10). Toutes ces observations montrent un rôle central des récepteurs P2X1 dans la régulation de la formation du thrombus.

2.2.2. La neuromodulation

Si les autres LGICs tels que les récepteurs GABAergiques et glutamatergiques ont un rôle majeur dans la transmission synaptique rapide, les récepteurs P2Xs semblent, eux, intervenir au niveau central dans la neuromodulation. C'est, dans un premier temps, l'observation d'une non-additivité des courants suite à une co-application d'ATP et d'acétylcholine (~80% du courant attendu) qui a suggéré une interdépendance des récepteurs P2Xs et des récepteurs nicotiniques (Zhou and Galligan, 1998) (Nakazawa, 1994). D'autres inhibitions croisées impliquant les récepteurs P2Xs et les récepteurs sérotoninergiques (Boué-Grabot et al., 2003) ou $GABA_A$ (Sokolova et al., 2001) ont par la suite été caractérisées. Il s'agit d'une inhibition fonctionnelle qui repose sur une interaction physique entre l'extrémité C-terminale intracellulaire de P2X et une boucle intracellulaire du récepteur pentamérique. Une inhibition des récepteurs NMDA de l'hippocampe a également été observée mais il semblerait que le mécanisme impliqué passerait par une voie calcium médiée de régulation (Pankratov et al., 2002).

D'autre part, la localisation plutôt péri-synaptique des récepteurs P2X2, P2X4 et P2X7 sur des neurones glutamatergiques dans le cerveau (Richler et al., 2011) suggère un rôle modulateur de ces récepteurs. Des premiers travaux ont pu montrer que la libération d'ATP par les cellules astrocytaires active les récepteurs P2X7 post-synaptiques des neurones magnocellulaires de l'hypothalamus, et que l'influx de calcium active alors la phosphatidylinositolkinase de type 3 (PI3K), ce qui provoque une augmentation de la densité de récepteurs AMPA à la membrane du neurone post-synaptique (Gordon et al., 2005). Cependant, ce phénomène semble restreint à des populations de neurones particulières du fait de l'expression neuronale réduite du sous-type P2X7.

Une régulation des récepteurs AMPA sûrement plus commune a été récemment identifiée par l'équipe de Boué-Grabot (Pougnet et al., 2014). L'ATP libérée suite à l'activation noradrénergique des astrocytes active les récepteurs P2X postsynaptiques, ce qui diminue l'amplitude des courants miniatures excitateurs postsynaptiques (mEPSC) des neurones de l'hippocampe. Cette inhibition des courants glutamatergiques est en fait due à une diminution de la densité des récepteurs AMPA à la membrane qui fait suite à l'endocytose clathrine et dynamine dépendante calcium-médiée (Figure 1.11). Les récepteurs P2Xs jouent ainsi un rôle important dans la régulation de l'expression de surface des AMPAR et régulent de ce fait la force et la plasticité synaptique.

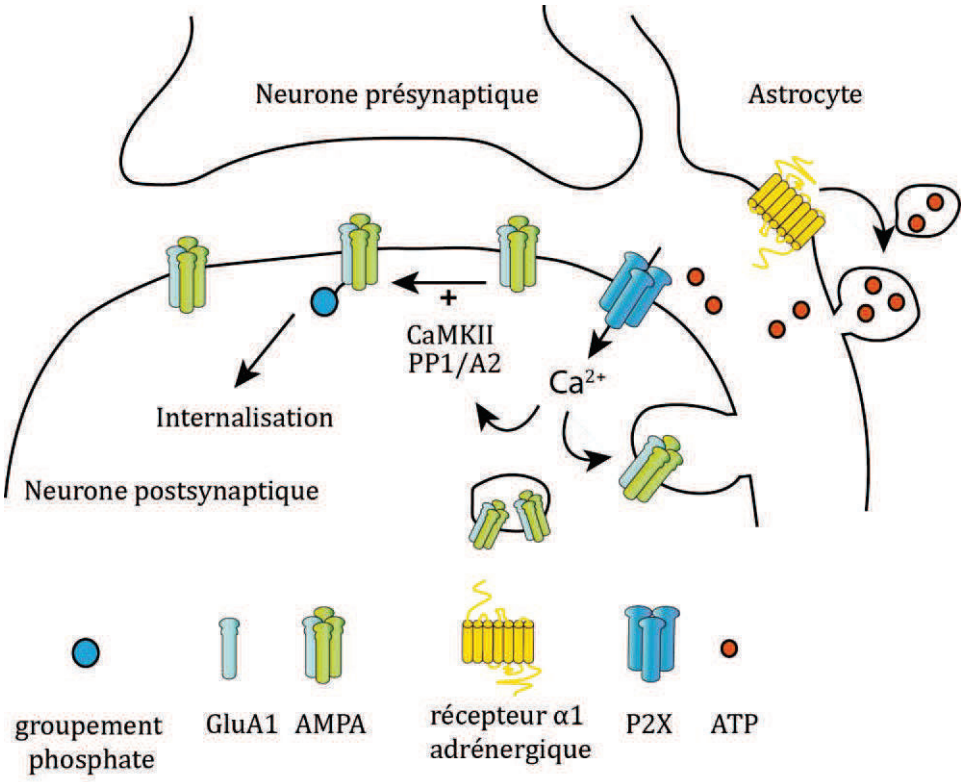


Figure 1.11 : Régulation du trafic des récepteurs AMPA dans l'hippocampe. L'activation des récepteurs astrocytaires adrénergiques entraîne une libération d'ATP dans la fente synaptique qui active alors les récepteurs P2Xs. L'entrée de calcium entraîne l'endocytose calcium médiée des récepteurs AMPA postsynaptiques ainsi que l'activation des protéines CaMKII et des phosphatases 1 et A2 qui régulent le niveau de phosphorylation de la sous-unité GluA1, phénomène impliqué dans l'internalisation des récepteurs. Ces mécanismes aboutissent à une dépression synaptique de longue durée (adapté de Pougnet, 2013).

2.2.3. La nociception

La nociception peut être définie comme la détection par l'organisme d'un stimulus pouvant lui nuire aboutissant à la sensation de douleur. Elle implique plusieurs populations de neurones qui permettent de transmettre l'information sensorielle périphérique ou viscérale vers le cortex. Les neurones sensoriels primaires qui véhiculent cette information sont appelés nocicepteurs et possèdent des extrémités périphériques dites libres, *a contrario* des neurones sensoriels non nociceptifs dont les extrémités sont spécialisées. Ils proviennent principalement de neurones ayant des corps cellulaires de moyen et faible diamètre (compris entre 25 et 50 µm pour les fibres Aδ, faiblement myélinisées, et inférieur à 25 µm pour les fibres C non myélinisées) localisés dans le ganglion spinal, le ganglion plexiforme ou le ganglion trigéminé en fonction de leur provenance (Snider and McMahon, 1998). Chaque nocicepteur possède un nombre important de récepteurs (ionotropiques et métabotropiques) et de canaux (mécanosensibles et thermosensibles) permettant de détecter des stimuli de nature physique ou chimique. Ces nocicepteurs projettent vers la corne dorsale de la moelle épinière. Le rôle de l'ATP en tant que messager de la douleur fut d'abord suggéré par la sensation douloureuse induite par l'application d'ATP sur des terminaisons nerveuses sensorielles de la peau et de la langue (Bleehen and Keele, 1977; Collier et al., 1966), il est maintenant bien étayé . La libération d'ATP au niveau périphérique est consécutive à un dommage cellulaire, une distension mécanique, une hypoxie, un médiateur chimique ou un stress thermique. Si tous les sous-types de récepteurs P2Xs peuvent être identifiés sur les nocicepteurs, les homotrimères P2X3 et les hétérotrimères P2X2/3 sont les plus abondants. L'activation de ces récepteurs entraîne la dépolarisation de la membrane et la propagation d'un potentiel d'action jusqu'à la synapse de la corne dorsale où du glutamate ainsi que d'autres substances telles que la substance P, le CGRP ou l'ATP par exemple, sont libérés. Le neurone postsynaptique, qui projette vers le thalamus, est alors dépolarisé par l'activation des récepteurs glutamatergiques ionotropiques (NMDA et AMPA) et purinergiques (P2X2, P2X4, P2X6). L'ATP libérée dans la synapse peut également agir sur des récepteurs P2X3 présynaptiques, amplifiant alors l'exocytose calcium-médiée de glutamate. Un contrôle négatif par un interneurone GABAergique permet par ailleurs d'hyperpolariser le neurone postsynaptique (Lemoine et al., 2012) (Figure 1.12).

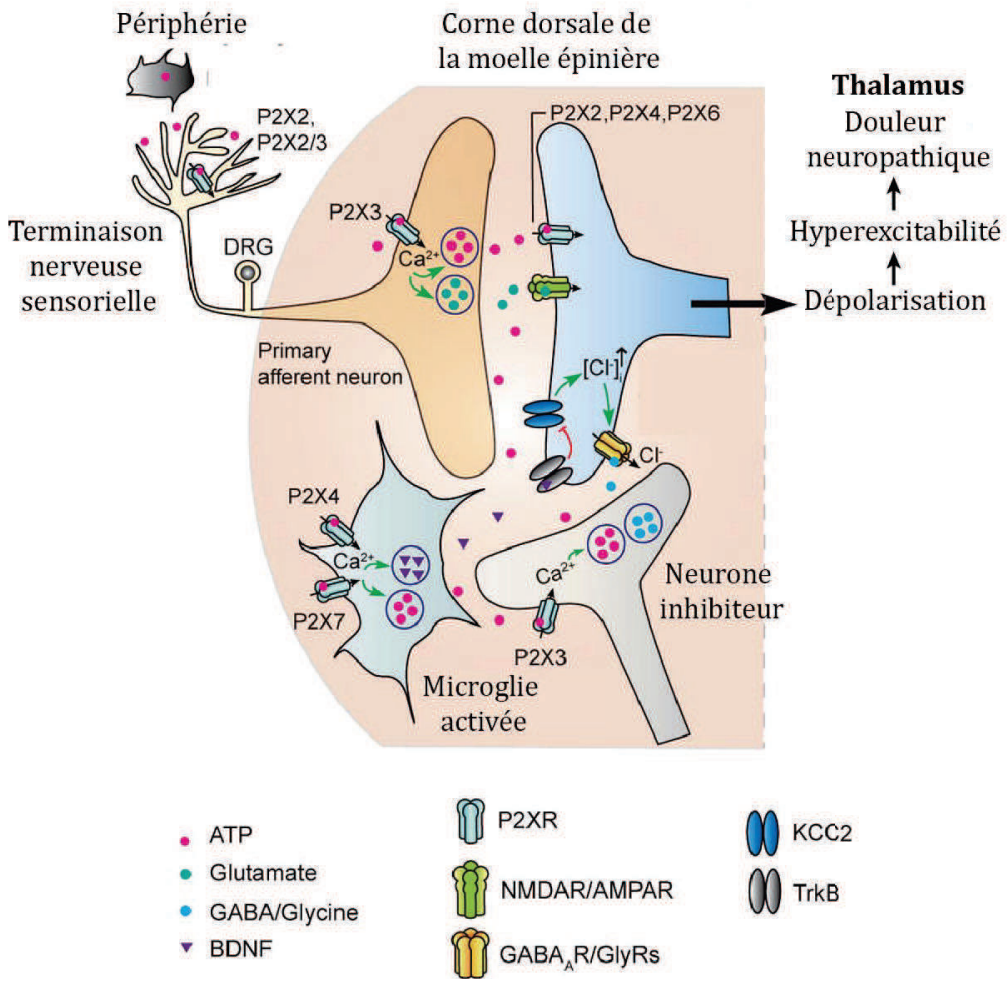


Figure 1.12 : Nociception et douleur neuropathique. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la transmission de la douleur impliquant les LGICs dans le système nerveux. L'atteinte de la voie de signalisation entraîne une hyperexcitabilité du neurone post-synaptique se traduisant par une douleur neuropathique (Lemoine et al., 2012).

2.2.4. La douleur neuropathique

La douleur neuropathique est définie comme une douleur secondaire à une lésion ou une maladie affectant le système somato-sensoriel. Elle touche près de 7% de la population et elle est réfractaire aux antalgiques usuels. La première évidence de l'implication de récepteurs P2Xs dans cette pathologie date de 2003 où des travaux ont permis d'observer une diminution de l'allodynie (hypersensibilité à un stimulus non douloureux) suite à l'injection intrathécale d'oligonucléotides antisens bloquant l'expression de P2X4 (Tsuda et al., 2003). La localisation de ce sous-type dans la corne dorsale est microgliale. Les souris déficientes en P2X4 ne présentent pas d'hyperalgésie et la libération de BDNF par la microglie est diminuée (Ulmann et al., 2008). De même, les souris knock-out en P2X7 montrent une diminution de l'allodynie (Chessell et al., 2005). Enfin, des femmes présentant

la mutation R270H sur l'ectodomaine de P2X7, mutation qui induit une hypofonctionnalité du récepteur, présentent une douleur post-chirurgicale significativement moins intense que les autres (Ide et al., 2014). Toutes ces observations ont conduit à proposer une implication des récepteurs P2X4 et P2X7 dans le phénomène de douleur neuropathique par une surexpression de ces récepteurs sur des cellules microgliales (Figure 1.12). Leur activation provoque la libération du facteur neurotrophique BDNF qui va alors activer les récepteurs à activité tyrosine kinase (TrKB) du neurone post-synaptique. Ces récepteurs inhibent l'expression du cotransporteur potassium-chlore (KCC2), ce qui induit alors une augmentation de la concentration de chlore intracellulaire et donc provoque une inversion du courant chlore médié par les récepteurs GABAergiques (stimulés par l'interneurone inhibiteur). La dépolarisation induite provoque donc une hyperexcitabilité du neurone qui n'est plus régulée et la sensation de douleur est constante (Lemoine et al., 2012).

En parallèle de cette voie, les récepteurs P2X3 sont également impliqués. En effet, l'utilisation d'ARN antisens et de siRNA (Hemmings-Mieszczak et al., 2003), d'inhibiteurs de cyclooxygénase supprimant l'expression de P2X3 (Wang et al., 2010), ou d'antagonistes (Jarvis et al., 2002) sur des modèles d'inflammation chez le rat, ont permis de diminuer les phénomènes d'allodynie et d'hyperalgésie. Ces observations peuvent être expliquées entre autre, par l'implication de P2X3 dans l'exocytose calcium médiée de glutamate décrite plus haut. Ainsi, les récepteurs P2Xs constituent une cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement de douleurs réfractaires aux antalgiques usuels.

2.2.5. Le processus d'angiogénèse dans un contexte tumoral

Le microenvironnement tumoral a une importance fondamentale dans l'évolution de la masse tumorale et il a été montré que l'ATP y est présent à des concentrations élevées (Pellegatti et al., 2008). De plus, un taux d'expression important de différents sous-types de récepteurs P2Xs a été mis en évidence dans des types de tumeurs variés (Adinolfi et al., 2015), de même que chez des enfants chinois atteints d'une leucémie aigüe (Chong et al., 2010a). Dans les années 1980s, des premiers travaux *in vivo* sur des souris ont montré un effet positif d'injections intrapéritonéales quotidiennes d'ATP avec une inhibition de la croissance des tumeurs, une moindre cachexie et un temps de survie allongé (Rapaport, 1988). De plus, un effet synergique de l'administration d'ATP avec une radiothérapie a été

mis en évidence (Estrela et al., 1995). Les hypothèses avancées, outre le rôle de récepteurs P2Y et A2, ont été d'une part l'implication des récepteurs P2X5, connus pour induire la différenciation cellulaire au détriment de la prolifération, et d'autre part la stimulation de récepteurs P2X7 pro-apoptotiques (White and Burnstock, 2006). Cependant, les trois essais cliniques lancés sur des patients atteints de cancer du poumon inopérable n'ont pas montré d'efficacité de l'administration d'ATP (Agteresch et al., 2003; Haskell et al., 1998). Des études plus récentes tendent à prouver, au contraire, un rôle néfaste de l'ATP dans un contexte tumoral, notamment sur les phénomènes d'invasion métastatiques. L'angiogénèse, qui est un phénomène déterminant dans la croissance d'une tumeur et dans sa dissémination, implique une prolifération des cellules endothéliales, une dégradation de la matrice extracellulaire et la formation de nouveaux vaisseaux. La molécule centrale impliquée dans ce processus est le VEGF dont la transcription est activée par HIF-1 inductible par une hypoxie locale. Or il est apparu que P2X2 et P2X4 sont surexprimés dans les neurones d'hippocampe soumis à une hypoxie *in vitro* (Cavaliere et al., 2003). De plus, la libération du facteur VEGF par P2X7 a été mise en évidence dans différentes lignées cancéreuses et dans des monocytes primaires (Chong et al., 2010b; Hill et al., 2010; Wei et al., 2008). Les tumeurs exprimant P2X7 présentent une vascularisation dense et bloquer ce récepteur réduit la libération de VEGF (Adinolfi et al., 2012; Chong et al., 2010b). Enfin, P2X7 favorise la libération d'enzymes protéolytiques par les cellules gliales et la réorganisation du cytosquelette des cellules cancéreuses afin de permettre la dissémination métastatique (Jelassi et al., 2013; Murphy and Lynch, 2012; Takai et al., 2012). Il apparaît donc que les récepteurs P2Xs jouent un rôle important dans l'invasion de l'organisme par les cellules cancéreuses et les cibler semble être une voie thérapeutique prometteuse dans des stratégies anticancéreuses.

2.3. Pharmacologie

Le développement de molécules ciblant sélectivement les récepteurs purinergiques est un domaine en plein essor mais du fait de leur identification plutôt tardive par rapport aux autres membres des LGICs aucun médicament n'est encore sur le marché. Au vu de l'importance de ces canaux dans les nombreuses voies physiologiques et depuis la récente résolution de structures cristallographiques de P2X4 qui a fournit de précieuses

informations, l'intérêt pour ces cibles est croissant et le nombre d'études concernant le développement de ligands et de modulateurs est en constante augmentation.

Toutes les sous-unités de P2X peuvent s'assembler en homotrimères fonctionnels, exceptées P2X6, et peuvent également former des hétérotrimères (Collo et al., 1996; North, 2002). Ces constructions ont pu, dans un premier temps être distinguées par leurs profils d'activation relativement spécifiques (Figure 1.9) mais la nécessité d'outils pharmacologiques permettant de différencier les différents sous-types, notamment *in vivo*, s'est très vite fait ressentir pour disséquer les effets physiologiques spécifiques à chacun. Si pour l'instant, aucun agoniste spécifique d'un sous-type n'a pu être identifié, le développement d'antagonistes semble être plus prometteur. Le but de chapitre est d'identifier, parmi toutes les molécules présentant une activité pharmacologique, celles pouvant être utilisées dans des études de voies de signalisation.

2.3.1. Les agonistes

L'ATP est le ligand endogène de cette famille de récepteurs et présente une affinité de l'ordre de 1 à 10 µM pour les différents sous-types, excepté pour P2X7 pour lequel l'affinité est de l'ordre du millimolaire (Table 1.2). Cette famille est assez restrictive quand à son activation par des agonistes, puisque les dérivés nucléotidiques di- et monophosphates, pourtant proches structurellement, n'activent pas ces récepteurs, tout comme les autres nucléotides, exceptés l'UTP et le CTP qui peuvent être actifs avec une faible efficacité sur certains sous-types. Certains dinucléotides, tels que les diadénosines polyphosphates Ap_nA (n=3-7) ou les adénosines polyphosphates guanosines Ap_nG (n=3-6) sont également capables de les activer mais toujours avec une faible efficacité (Coddou et al., 2011a). Au vu de cette tolérance restreinte vis-à-vis de modifications mineures, le développement d'agonistes s'est centré exclusivement sur des analogues de l'ATP (Figure 1.13). Des modifications au niveau des différentes parties de cette molécule (ribose, adénine, groupements phosphate) ont été testées.

Le 2'(3')-O-4-benzoylbenzoyl-ATP (Bz-ATP), obtenu par l'introduction de groupements benzoyles sur le ribose, reste un bon agoniste pour tous les sous-types, cependant, sur P2X7, il est plus efficace et possède une affinité apparente plus forte que celle de l'ATP (Jarvis and Khakh, 2009). De plus, il n'active pas les récepteurs P2Y à l'exception de $P2Y_{11}$ et $P2Y_{13}$.

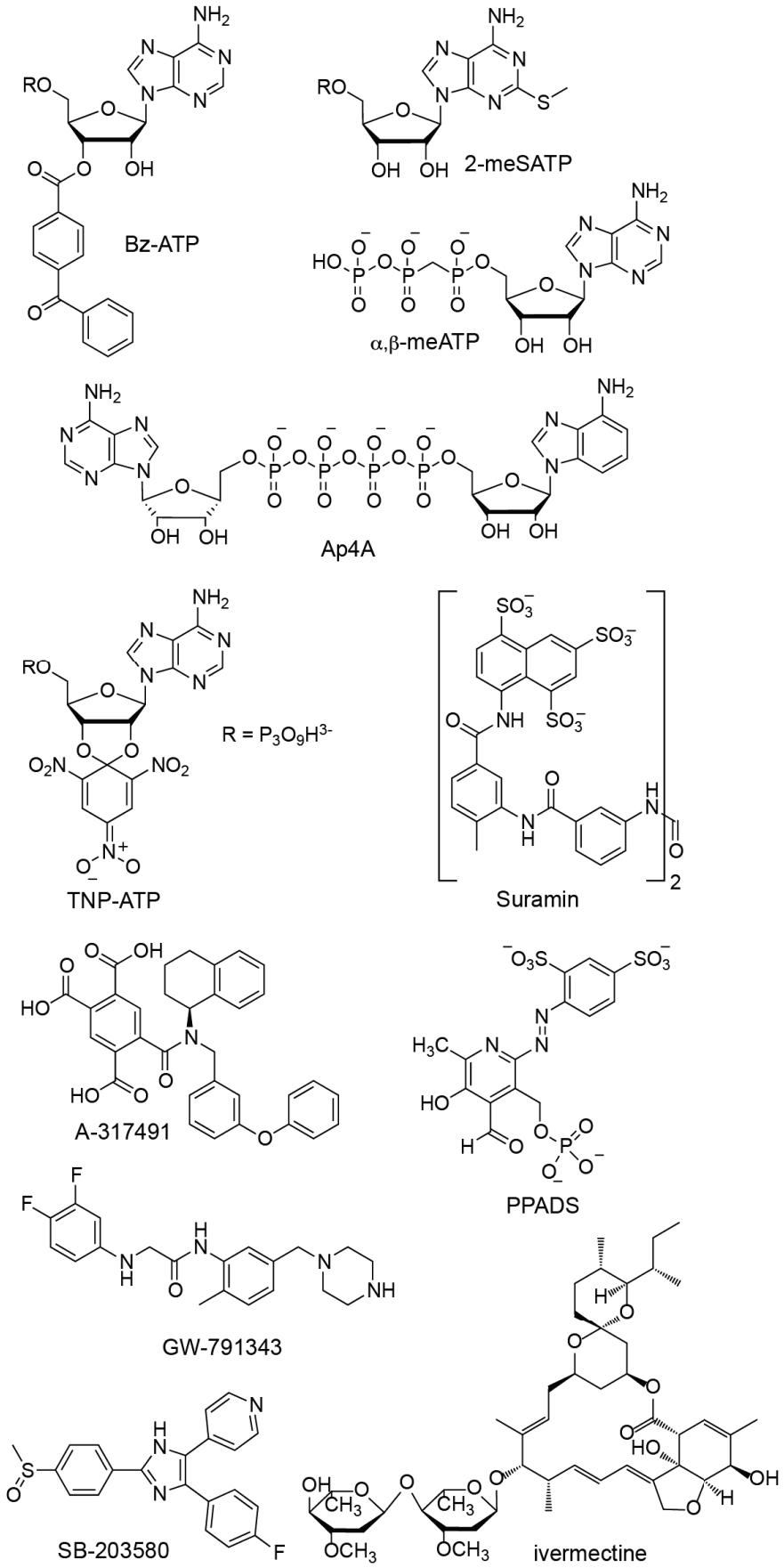


Figure 1.13 : Pharmacologie des récepteurs P2Xs. Structures chimiques des principaux agonistes, antagonistes et potentiateurs allostériques actifs sur les récepteurs P2Xs.

Le 2-methylthioATP (2-meSATP) est un agoniste entier avec une bonne affinité pour les différents sous-types qui n'active pas les récepteurs de l'adénosine, ce qui en fit un outil précieux pour distinguer ces deux familles (Coddou et al., 2011a).
La substitution d'un atome d'oxygène par un groupement méthylène permet de diminuer leur dégradation par les ectonucléotidases. Le dérivé β,γ-methylene-ATP (βγmeATP) est sélectif des sous-types P2X1 et P2X5, et le dérivé α,β-methylene-ATP (αβmeATP) des sous-types P2X1,P2X3 et P2X2/3. Ce dernier dérivé est utilisé pour distinguer l'hétérotrimère P2X2/3 des homotrimères : en effet, il n'active pas P2X2 à des concentrations inférieures à 100 µM et provoque une désensibilisation très rapide sur P2X3, ce qui n'est pas le cas sur P2X2/3 (Coddou et al., 2011a).
Au vu de ces résultats, on remarque aisément que la caractérisation pharmacologique des récepteurs P2Xs par l'utilisation d'agonistes sélectifs reste pour l'instant inaccessible.

2.3.2. Les antagonistes

La nature des antagonistes est quant à elle plus variée, on y trouve certes, des dérivés de nucléotides, mais également des molécules organiques telles que la suramine, le pyridoxal phosphate ou des anthraquinones (Figure 1.13). Certains sont peu sélectifs mais des dérivés ont pu être développés et ouvrent la voie à un développement chimique ultérieur.
Les dérivés de nucléotides possédant le groupement trinitrophényle sur le ribose sont des antagonistes efficaces. Le trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP) permet de distinguer les sous-types P2X1, P2X3 et P2X2/3 pour lesquels il a une affinité de l'ordre du nanomolaire, des autres récepteurs. Cependant, il est rapidement dégradé *in vivo* ce qui limite sont utilisation (Lewis et al., 1998).
La suramine et ses dérivés sont des urées polysulfatées symétriques de haut poids moléculaire. Le chef de file est actif sur un grand nombre de cibles et est utilisé à l'origine comme anthelminthique (Jacobson et al., 2002). Deux analogues (NF279 et NF449) se sont révélés être des antagonistes compétitifs sélectifs de P2X1 (Kassack et al., 2004; Klapperstück et al., 2000) et ont été utilisés notamment pour identifier le rôle de P2X1 dans l'aggrégation plaquettaire, alors que NF770 semble être un chef de file sélectif de P2X2 (Wolf et al., 2011). Il est apparu également que les sous-types P2X4 et P2X7 sont

relativement résistants à l'action des suramines. Les dérivés du pyridoxal phosphate, dont le chef de file est le PPADS non-sélectif, semblent également être prometteurs (MRS2220, MRS2159 et MRS2257) quant à leur sélectivité sur P2X1 (Kim et al., 2001).
Des dérivés d'anthraquinone développés à partir du « reactive blue 2 », nommés PSB1011 et PSB10211, semblent eux cibler préférentiellement le sous-type P2X2 (Baqi et al., 2011).
Le sous-type P2X3, homotrimérique ou en hétérotrimère peut être, quant à lui, discriminé par des analogues de la triméthoprime comme le composé AF-353 (ou RO-4) (Carter et al., 2009), ou un dérivé organique nommé A-317491 (Wu et al., 2004), alors que le composé RO-85 est sélectif de l'homotrimère (Carter et al., 2009).
Récemment, un effet antagoniste d'un antidépresseur sérotoninergique, la paroxétine (Nagata et al., 2009), a pu être mis en évidence sur rP2X4, ainsi que celui d'un dérivé diazépine, le 5-BDBD (Gunosewoyo and Kassiou, 2010).
Enfin, un dérivé issu d'une chimiothèque industrielle, l'AZ11645373 est un antagoniste allostérique des récepteurs hP2X7 à des concentrations nanomolaires (Stokes et al., 2006).
Ainsi, depuis une vingtaine d'années, différentes molécules ont pu être identifiées comme antagonistes plus ou moins sélectifs suite à des criblages de chimiothèques, des observations fortuites ou à un développement rationnel et des chefs de files d'intérêt se sont dégagés, ouvrant la voie à l'élaboration de séries chimiques.

2.3.3. Les modulateurs allostériques

Nous nous sommes concentrés pour l'instant sur l'effet de molécules agissant sur le site orthostérique des récepteurs P2Xs, mais beaucoup d'autres composés viennent moduler l'action de l'agoniste natif qu'est l'ATP en agissant sur des sites situés à distance du site de liaison, on parle alors de modulateurs allostériques.
Parmi eux, les métaux sous leur forme ionique jouent un rôle clé : on les retrouve au niveau physiologique en faible quantité, mais certains sont concentrés et stockés dans des vésicules avec les neurotransmetteurs (Kuo et al., 2001; Palmiter and Huang, 2004). Ils peuvent alors être libérés dans le milieu extracellulaire, en particulier la fente synaptique, et certaines études ont pu montrer que leur concentration pouvait alors être de l'ordre de la centaine de micromolaire (Kardos et al., 1989). Le plus étudié est le zinc (Zn^{2+}) : ses effets diffèrent selon le sous-type et l'espèce (Coddou et al., 2011b). Sur les récepteurs rP2X2, le zinc a un effet

biphasique : à faibles concentrations (10µM), il potentialise la réponse ATP alors qu'il l'inhibe à plus hautes concentrations (>100µM). Le site de haute affinité a été identifié récemment : il est formé par deux histidines situées en bordure de la mâchoire (Nagaya, 2005) formant la cavité du site de liaison de l'ATP (décrite ultérieurement au chapitre 2) et la chélation du zinc favorise l'ouverture du récepteur. Le site de basse affinité est quant à lui inconnu pour le moment. On peut discriminer les sous-types P2X2 et P2X4 en utilisant le cuivre ou le mercure car ils inhibent rP2X4 contrairement à P2X2. Cependant, ces deux métaux n'ont pas le même site de liaison puisque la réponse à l'ATP de mutants insensibles au cuivre peut être modulée par l'application de mercure (Coddou et al., 2005). On peut noter également que le cadmium potentialise la réponse de P2X2 et P2X4 alors qu'il inhibe les courants sur les sous-types P2X1, P2X3 et P2X7. Enfin, le gadolinium inhibe le sous-type zfP2X4 (Coddou et al., 2011b). Etant donné que la cristallisation du récepteur a été réalisée en présence de ce métal, les quatre sites de liaisons ont pu être déterminé : 3 sont situés en périphérie du récepteur et le quatrième au centre de la protéine dans le vestibule central (Kawate et al., 2009).

Les protons peuvent également avoir une influence sur la réponse à l'ATP des récepteurs P2Xs, ils inhibent tous les sous-types excepté P2X2. La potentiation observée sur rP2X2 est réduite par la mutation H319A résidu situé sur la partie basse de l'ectodomaine (Clyne et al., 2002).

Certains dérivés organiques sont également des modulateurs allostériques. Le plus documenté est l'ivermectine, une lactone macrocyclique antihelminthique. C'est un potentiateur sélectif du sous-type P2X4 (Agboh et al., 2004; Khakh et al., 1999a; Priel and Silberberg, 2004). Des chimères P2X2/P2X4 au niveau transmembranaire (Jelínková et al., 2006), des substitutions des résidus des deux hélices en cystéines (Jelínkova et al., 2008) ou tryptophane (Silberberg et al., 2007) et l'importance du résidu W46 (rP2X4) dans des intéractions π-cations (Popova et al., 2013) ont permis de situer le site de fixation de l'ivermectine à l'interface entre TM1 et TM2, où elle stabiliserait l'état ouvert. Une étude très récente montre également l'importance des résidus de la zone proche des fenestrations (Gao et al., 2015). On peut également noter l'effet potentiateur de l'antagoniste Cibacron Blue 3GA à de faibles concentrations sur les sous-types rP2X4 et hP2X3, l'effet de l'environnement lipidique ou des alcools : une revue très complète détaille

			Sous-type de récepteur homotrimérique					
			P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X7
Classe	Classification	Composés	CE_{50} (µM)					
AGONISTES	Nucléotides et analogues	ATP	0,1-0,7	2-8	1	1-10	0,5-4	2-4mM
		2-meSATP	0,1-1	1	0,3	10-100	0,5	200
		BzATP	0,7-24	6-30	-	3	1-6	10
		α,βmeATP	0,1-1	> 100	1-2	4-300	1-12	> 300
		β,γmeATP	2	> 300	> 300	> 300	10	> 300
		CTP				200		
		Ap_4A	0,04	15	1	2-10	0,3	
		Ap_5A	1-3		1		0,5	
			CI_{50} (µM)					
ANTAGONISTES	Nucléotides et analogues	TNP-ATP	0,006	2	0,001	15	0,6-0,7	> 30
		Ip_4I	0,6	inactif	1	1,7	-	-
		Ip_5I	0,003	inactif	3	0,002	-	-
	Suramines et analogues	Suramine	1-2	10	3	> 300	2-3	> 300
		NF279	0,02	1	2	-	-	3-20
		NF449	0,0005	-	3	-	-	40
		NF770	0,94	0,019	0,074	> 10	-	> 10
		NF023	0,2	-	8,5	> 100	-	-
		NF778	-	0,14	-	> 10	-	> 10
		NF110	-	-	0,036	-	-	-
	Pyridoxal phosphate et analogues	PPADS	1	1-3	1,5	> 300	0,2-0,6	10-45
		MRS2220	10	inactif	60	inactif	-	-
		MRS2159	0,009	-	0,15	-	-	5
		MRS2257	0,01	0,3	0,03	-	-	-
		PPNDS	0,015	-	-	-	-	1-10
	Dérivés d'anthraquinone	RB2	-	0,5	45	-	-	-
		PSB1011 (RB4)	0,4	0,079	0,5	> 10	-	> 10
		PSB10211	-	0,086	-	-	-	-
	Analogues du triméthoprime	AF-353 (RO-4)	> 100	> 100	0,013	> 100	> 100	> 100
		RO-51	> 10	> 10	0,01	> 10	> 10	> 10
	Autres composés organiques	RO-85	> 10	> 10	0,03	> 10	> 10	> 10
		A-317491	> 10	> 100	0,02	> 100	-	-
		paroxétine	-	-	-	2	-	-
		5-BDBD	-	-	-	0,5	-	0,005-0,01
		AZ11645373	-	-	-		0,5	0,015-0,25
		BBG	> 5	1,4	> 10	3-100	-	-
			EC_{50}/CI_{50} (µM)					
MODULATEURS ALLOSTERIQUES	Macrocycle	ivermectine		inactif	inactif	(+) 3		inactif
	Cations métalliques	Zn^{2+}	(-) 1	(+) 30	(+) 10	(+)5	(+) 10	(-) 80
		Cu^{2+}		(+) 3		(-) 10		(-) 2
		Hg^{2+}		(+) 3		(-) 10		(-) 10
		Cd^{2+}	(-)	(+) 3 - 100	(-) 100	(+) 20		(-) 100
		Gd^{3+}	(-) 10	(-) 1				
	Protons	H^+	(-) pKa 6,3	(+) pKa7,3	(-) pKa 6,0	(-) pKa 7,0	(-)	(-) pKa 6,1
	Autres composés	CB3GA			(+) 1,5	(+) 3		
		Ethanol		(-) 0,1	(+) 0,025	(-) 0,06		

Table 1.2 : Pharmacologie des récepteurs P2Xs. (+) modulateur positif (-) modulateur négatif - non testé ou non déterminé (adapté de Coddou et al., 2011a et 2011b, Burnstock, 2014, Bölcskei and Farkas, 2014 et Khakh and North, 2012).

ces aspects (Coddou et al., 2011b). Enfin, l'état d'oxydation de la cellule a également une influence par le biais des ROS (Reactive Oxygen Species) (Coddou et al., 2009).
Ainsi, il apparaît que de nombreux facteurs de l'environnement cellulaire viennent réguler l'activité de ces récepteurs, ce qui permet *in vivo* un contrôle fin des effets engendrés par l'activation de ces canaux.

2.3.4. Les molécules développées en vue d'une application thérapeutique

Au vu de la multitude de voies physiologiques et pathologiques dans lesquelles sont impliqués les récepteurs P2Xs, il n'est pas étonnant de voir les efforts fournis par les laboratoires et par l'industrie pharmaceutique pour développer des candidats médicaments potentiels. Les pathologies ciblées sont, de plus, largement répandues et le marché potentiel particulièrement rentable. En effet, plusieurs domaines peuvent être explorés, notamment le système nerveux. Pour ne citer que quelques exemples, le développement d'antagonistes de P2X3 ou P2X4 pourrait conduire à des antalgiques intéressants à utiliser dans les cas de douleurs neuropathiques, des antagonistes de P2X7 pourraient avoir un intérêt dans le traitement d'épilepsies ou être utilisés comme neuroprotecteurs dans un contexte de maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson où il a été montré que la composante inflammatoire était délétère. Cependant, ce type de thérapeutique nécessite des molécules qui répondent à des critères assez stricts en terme de paramètres biophysiques pour espérer passer les différentes étapes d'essais pré-cliniques et cliniques avec succès. Outre les règles de Lipinski, connues également sous le nom de règle des 5 (Lipinski et al., 2001), deux autres indices ont été défini, le BEI (binding efficiency index) et le MPO (multi-parameter optimization), pour les médicaments qui ciblent le système nerveux central. Le score de MPO (Wager et al., 2010) est établit sur la base de six critères physicochimiques calculés in silico : le ClogP (un coefficient de distribution représentant la lipophilie), le ClogD (un coefficient de distribution qui tient compte des charges de la molécule à pH 7 .4), le TPSA qui rend compte de la surface polaire, le poids moléculaire, le HBD (Hydrogen Bond Donnor), et le pK_a. Un score inférieur à 4 est défavorable dans la mesure où la probabilité d'échec en développement clinique est forte. Le BEI (Abad-Zapatero and Metz, 2005) représente quand à lui l'efficacité relative du composé par rapport à son poids moléculaire, il doit être supérieur à 19. Il n'y a pas, à ma

connaissance, de molécules en phase d'essais cliniques ciblant P2X dans le système nerveux central, ceci peut s'expliquer par le fait que la découverte d'antagonistes présentant une sélectivité suffisante est récente : on devrait voir dans les prochaines années un nombre croissant de molécules testées dans ce domaine.

Par ailleurs, dans le cadre d'une approche anticancéreuse, le développement d'antagonistes pourrait être une voie complémentaire aux traitements actuels.

Dans toutes les pathologies inflammatoires, les antagonistes de P2X7 pourraient avoir leur place. Un dérivé (AZD9056) a d'ailleurs été testé pour améliorer les symptômes de l'arthrite rhumatoïde mais il a échoué en phase IIb d'essais clinique par manque d'efficacité (Keystone et al., 2012). Un modulateur allostérique (GSK1482160) de P2X7, destiné à traiter des douleurs inflammatoires, a, lui, été arrêté en phase I.

Enfin, cibler P2X1 semble être une voie prometteuse dans le cadre de pathologies cardiovasculaires telles que la prévention de thrombose ou de la pré-éclampsie.

Cependant, à partir du moment où l'on aura réussi à développer des molécules suffisamment sélectives, plusieurs problèmes vont peut-être se poser : de part la large distribution des récepteurs P2Xs, il est possible que de nombreux effets secondaires indésirables viennent contre-balancer l'effet bénéfique apporté par le candidat médicament.

Ainsi, ce chapitre montre d'une part que le nombre d'outils pharmacologiques et *a fortiori* thérapeutiques, actuellement à notre disposition pour cette famille de récepteurs, est trop faible et que leur utilisation est limitée par leur manque de sélectivité et leur sensibilité au métabolisme, même si des progrès significatifs ont été réalisés ces dernières années. On remarque d'autre part, l'inconvénient de la pharmacologie conventionnelle qui nécessite des efforts considérables afin de trouver un outil sélectif d'un sous-type et surtout une molécule susceptible d'avoir une utilisation thérapeutique.

Chapitre 2 : Aspects moléculaires des récepteurs P2Xs

Abordons maintenant les récepteurs P2Xs sous un angle structural. En effet, une compréhension à l'échelle moléculaire des mécanismes impliqués dans le fonctionnement de ces récepteurs est devenue déterminante. Depuis leur découverte, nombreuses sont les études expérimentales explorant les relations structure-fonction de ces récepteurs, mais la résolution récente des structures cristallographiques de l'état fermé en 2009 (Kawate et al., 2009), puis d'un état ouvert en 2012 (Hattori and Gouaux, 2012), a été fondamentale pour la compréhension à une échelle jusqu'alors inaccessible, du mécanisme de reconnaissance de l'ATP, et a ouvert la voie à une exploration fine des mouvements moléculaires induits lors du gating.

Je vais, dans une première partie, détailler la structure de ces récepteurs puis, j'aborderai le phénomène de gating sous un angle moléculaire et le concept d'allostérie appliqué aux récepteurs P2Xs en décrivant les différents états conformationnels qui ont pu être identifiés.

1. Description structurale

1.1. Architecture générale

Etant donné l'absence d'homologie de séquence avec d'autres récepteurs connus, ce sont des études moléculaires et biochimiques qui ont fourni les premières informations structurales sur ces récepteurs. L'architecture trimérique, longtemps débattue avant les années 2000s, a été suggérée par des études d'immunohistochimie en gels natifs de polyacrylamide des sous-types P2X1 et P2X3 pontés par du PPAPA (Nicke et al., 1998). Des études ultérieures sur P2X2 (Aschrafi et al., 2004) et P2X7 (Becker et al., 2008), la construction de concatémères de P2X2 (Stoop et al., 1999) et le pontage de résidus cystéines introduits sur des hétéromère P2X2/3 (Jiang et al., 2003) ont, par la suite, confirmé cette hypothèse. Cette dernière méthode repose sur la capacité de deux cystéines à former un pont disulfure entre leur groupement thiol lorsque les contraintes de distance et d'orientation des chaînes latérales sont remplies. Ainsi, la formation de ce lien covalent reflète une proximité spatiale entre les deux résidus : moins de 4,5Å entre les carbones β. Cette réaction est réversible par l'ajout d'agents réducteurs tels que le DTT ou le TCEP.

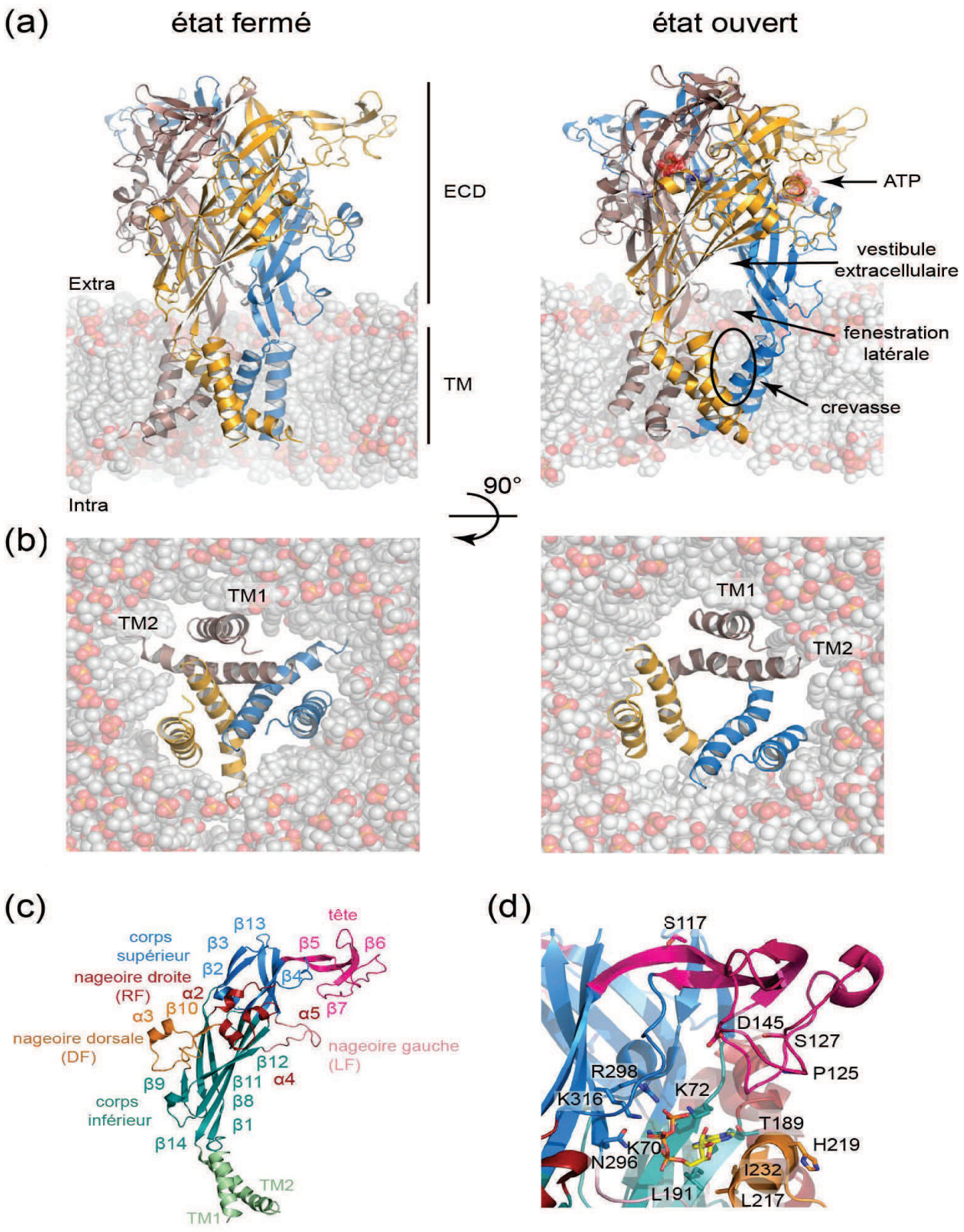


Figure 2.1 : Architecture du récepteur P2X4. Structures cristallographiques de zfP2X4 (a) vue latérale et (b) vue du milieu extracellulaire, chaque sous-unité est représentée par une couleur différente. (c) architecture d'une sous-unité, analogie avec un dauphin. (d) Le site de liaison de l'ATP (adapté de Kawate et al., 2009, Hattori and Gouaux, 2012).

L'analyse cinétique des courants électrophysiologiques obtenus lors d'enregistrements en canal unique (Ding and Sachs, 1999) ou le calcul du coefficient de Hill issu des courbes dose-réponse à l'ATP (Bean et al., 1990) prédisaient également cet assemblage. Les premières structures à basse résolution de P2X ont été fournies par des techniques de microscopie à force atomique AFM (Barrera et al., 2005) et par des techniques de microscopie électronique couplées avec du FRET (Mio et al., 2005; Young et al., 2008a). La résolution obtenue par cryomicroscopie de 15Å était suffisante pour distinguer la stœchiométrie d'assemblage en trimère ainsi que les voies par lesquelles pourraient transiter les ions. L'équipe de Gouaux confirma finalement cette topologie en fournissant une structure cristallographique à haute résolution (3,1 Å) (Kawate et al., 2009) (Figure 2.1).

Des analyses de séquences (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994) d'une part, et des expériences biochimiques (Newbolt et al., 1998; Vulchanova et al., 1996) d'autre part, ont permis de prédire assez rapidement après le clonage de ces récepteurs mais succinctement, l'organisation générale d'une sous-unité composée de deux segments transmembranaires aux extrémités C- et N-terminales intracellulaires, séparés par un large domaine extracellulaire glycosylé et riche en ponts disulfures qui contient le site de liaison de l'ATP. Kawate et al. précisèrent cette organisation et la comparèrent de manière imagée à un dauphin (Kawate et al., 2009). Sur le corps de l'ectodomaine, composé de résidus hautement conservés qui s'organisent en 14 feuillets β, quatre autres domaines (la tête, les nageoires gauche, droite et dorsale) plus flexibles et moins conservés sont attachés (Figure 2.1). Les domaines TM1 sont positionnés en périphérie alors que les segments TM2, inclinés de 45° par rapport à la membrane, forment le pore ionique. Ils se croisent à la moitié de leur longueur environ pour former une barrière hydrophobique centrée sur le résidu A344 zfP2X4 (Figure 2.3). Cette structure cristallographique permit de comprendre l'assemblage général au niveau moléculaire entre les monomères, chacun s'enroulant sur autour de son voisin dans la partie extracellulaire, et de mettre en évidence les différentes interfaces intra et inter sous-unités.

1.2. Le site orthostérique

1.2.1. Travaux antérieurs à la résolution de la structure cristallographique

Identification des résidus ayant une proximité spatiale avec l'ATP

Dès la découverte de ces récepteurs, les efforts de nombreuses équipes se sont concentrés sur la compréhension du mécanisme de liaison de l'ATP dans son site, du fait, notamment, de l'apport considérable que cette connaissance apporterait quand au développement d'outils pharmacologiques. Le premier obstacle rencontré fut l'absence de motifs consensus identifiés auparavant sur d'autres protéines liant l'ATP, tels que les motifs de Walker des ATP-synthases (Walker et al., 1982) ou le motif Q de certaines RNA-hélicases (Tanner et al., 2003). Une soixantaine de résidus conservés de l'ectodomaine ont alors été systématiquement mutés par mutagénèse dirigée et caractérisés électrophysiologiquement afin de comprendre leurs rôles et leur implication ou non dans la reconnaissance de l'ATP et d'identifier les interactions mises en jeu. (pour une revue complète se référer à (Chataigneau et al., 2013)).

Une des stratégies couramment utilisée est la substitution systématique des résidus en résidus cystéines. La réactivité du groupement thiol des cystéines est alors exploitée pour marquer spécifiquement des résidus avec des composés réactifs tels que l'argent ou les dérivés du methanethiosulfonate (MTS), cette méthode étant appelée substitued cystein accessibility method (SCAM) (Karlin and Akabas, 1998). On est ainsi capables de modifier la chaîne latérale de l'acide aminé s'il est accessible au composé donc au solvant. La variété des réactifs utilisés (chargés, biotinylé, hydrophobe…) permet de tester de nombreuses hypothèses concernant le microenvironnement du résidu (Figure 2.2).

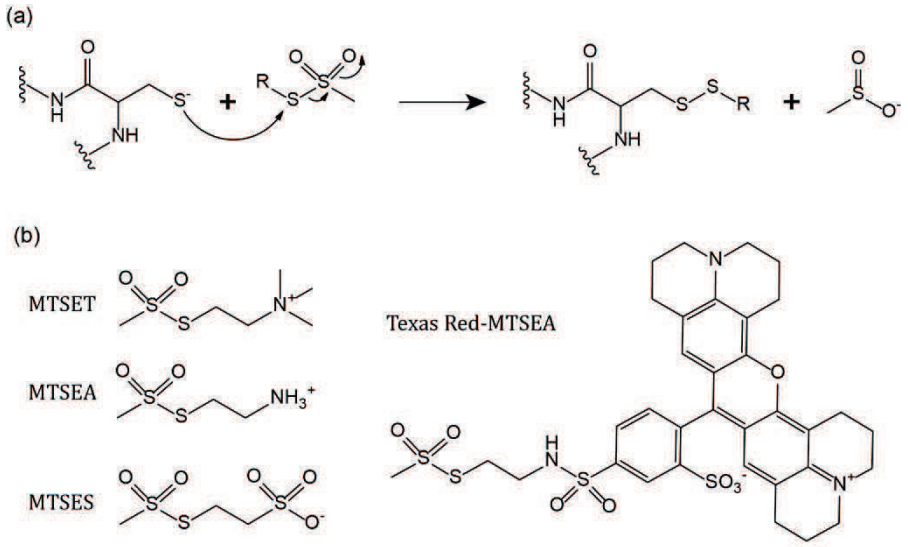


Figure 2.2 : Substitued cysteine accessibility method (SCAM). (a) schéma de la réaction d'un dérivé MTS avec une cystéine de la chaîne polypeptidique. (b) exemples de composés MTS utilisés pour la caractérisation de P2X (adapté de Karlin and Akabas, 1998).

Concernant les récepteurs P2Xs, le fait que des résidus chargés positivement jouent un rôle essentiel dans la reconnaissance de la chaîne poly-phosphate a été proposé rapidement et l'identification du motif KxKG conservé entre les différents sous-types (Digby et al., 2005) a orienté la mutagénèse. Le rôle crucial des résidus K70 et K72 (zfP2X4) a été mis en évidence par une perte notoire de la sensibilité à l'ATP suite à une substitution en résidus non chargés tels que les alanines ou les cystéines, et à sa restauration par le marquage au MTSEA, composé permettant de mimer la chaîne latérale de la lysine (Ennion et al., 2000; Jiang et al., 2000; Wilkinson et al., 2006). De même, l'importance des résidus K316 et K193 a été largement étudiée au sein des différents sous-types (Fischer et al., 2007; Jiang et al., 2000; Yan et al., 2006; Zemkova et al., 2007), tout comme l'implication de l'arginine R298 (zfP2X4) (Ennion et al., 2000; Fischer et al., 2007; Jiang et al., 2000; Roberts and Evans, 2007; Roberts et al., 2008). Les mêmes stratégies de substitution ont été utilisées sur des résidus polaires pouvant former des liaisons hydrogènes avec l'ATP, et des résidus aromatiques : elles ont identifié les résidus N296, F297, F188 et T189, comme essentiels pour l'action de l'ATP (Jiang et al., 2000; Roberts and Evans, 2006; Roberts et al., 2008, 2009).
Cependant, le problème majeur rencontré avec ce type d'approche est la difficulté à distinguer un rôle dans la coordination de l'ATP d'un rôle dans le gating des résidus identifiés. D'autres stratégies ont donc été développées pour affiner ces résultats.

Deux techniques différentes de marquage d'affinité peuvent être envisagées : le marquage spécifique de site ingénieré et le marquage par photoaffinité. Elles utilisent toutes deux un analogue de substrat porteur d'un groupement réactif pour marquer spécifiquement le site de liaison.
La première approche (engineered site diriged affinity labelling) découle du marquage d'affinité développé pour l'identification des sites catalytiques enzymatiques. Elle consiste à concevoir un dérivé du ligand portant un groupement réactif vis-à-vis des cystéines pour marquer les résidus ciblés. On détecte l'efficacité du marquage par l'effet potentiellement induit sur la fonction du récepteur et par sa réversibilité suite à l'application d'un agent réducteur tel que le DTT (Foucaud et al., 2001). Elle a été utilisée avec succès pour sonder le site actif des récepteurs nicotiniques grâce à une sonde MBTA ou BrACh (Chabala and Lester, 1986; Kao et al., 1984), pour l'identification du site de liaison de la glycine (Foucaud et al., 2003) et de l'ifendorpil (Mony et al., 2009) sur les récepteurs glutamatergiques, et

développée de manière originale sur les récepteurs P2Xs dans le but d'identifier le site de liaison de l'ATP jusqu'alors inconnu (Jiang et al., 2011). L'application d'un dérivé thiol-réactif de l'ATP, le NCS-ATP, sur rP2X2 a ainsi pu anticiper la proximité spatiale de l'adénine avec le résidu L191 (zfP2X4). Cette sonde a également identifié un autre résidu N140C rP2X2 (D145C sur zfP2X4) potentiellement impliqué dans la reconnaissance des antagonistes.

La deuxième approche est le marquage par photoaffinité ou PAL, qui consiste à utiliser des dérivés du ligand capables d'être activés (formation d'une espèce radicalaire) par une irradiation pour former une liaison covalente avec les résidus situés à proximité (Kotzyba-Hibert et al., 1995). Cette technique a été développée sur les récepteurs nicotiniques pour lesquels elle a contribué à l'identification très précise des résidus du site actif (Galzi et al., 1991; Grutter et al., 2002; Mourot, 2005). L'utilisation d'une sonde radiomarquée de photoaffinité dérivée de l'ATP, le ^{32}P-2-azido ATP, sur des mutants cystéines de hP2X1, consécutive ou non à l'application de MTS, a pu confirmer l'implication des quatre lysines K70, K72, K316 et K193 et de la thréonine T189, identifiées auparavant, dans la coordination de l'ATP (Allsopp et al., 2011; Roberts and Evans, 2007; Roberts et al., 2009).

Lörinczi et al. ont, quant à eux, pu proposer une orientation du ribose proche de E122 (rP2X1) lors d'expériences de voltage-clamp fluorométrie (Lörinczi et al., 2012). Cette technique, tout d'abord développée sur les canaux potassium voltage-dépendants (Mannuzzu et al., 1996), combine mutagénèse, fluorescence et électrophysiologie pour détecter des changements conformationnels. Le fluorophore est couplé à un groupement réactif vis-à-vis des thiols afin de le fixer covalemment au mutant ingénieré. Le système d'enregistrement des courants électrophysiologiques est associé à un système permettant de mesurer la fluorescence de l'échantillon. On obtient ainsi des enregistrements simultanés de courants ioniques et de variations de fluorescence marquant un changement du microenvironnement du fluorophore.

La sonde fluorescente tétraméthyl-rhodamine-maléimide (TMRM) a été utilisée pour marquer des résidus situés sur la tête du récepteur (A118-I125) rP2X1 qui projette au dessus du site de liaison (Lörinczi et al., 2012). Pour le résidu E122C, les auteurs détectent une diminution de la fluorescence lorsque le Bz-ATP, un agoniste partiel, est appliqué (contrairement à l'augmentation observée en présence d'ATP). La cinétique de décroissance de la fluorescence étant proche de celle de l'activation du récepteur, ils en concluent que la

sonde interagit avec le groupement benzoyl fixé sur le ribose et donc que cette partie de la molécule est dirigée vers le solvant. Cette étude a fourni une information précieuse quant à l'orientation de la molécule dans son site.

Le site de liaison de l'ATP à l'interface entre deux sous-unités

L'exploration du site de liaison de l'ATP a ainsi montré l'importance de 4 clusters d'acides aminés (K70-K72, F188-T189-L191-K193, N296-F297-R298 et K316) dont 3 sont séparés d'une centaine de résidus. Cette observation a conduit à l'hypothèse que le site de liaison pourrait être formé par des résidus localisés sur deux sous-unités adjacentes. La coexpression d'une sous-unité K69A/K308A rP2X2, où la fixation de l'ATP est abolie, avec deux sous-unités P2X3 sauvages, conduisant à un mutant non fonctionnel, deux sites de liaison de l'ATP sont donc touchés par des mutations localisées sur une sous-unité (Wilkinson et al., 2006), ce qui confirme l'hypothèse de départ, de même que l'observation de trimères sur des gels SDS-PAGE suite à la formation d'un pont disulfure entre les résidus K68C et F291C de rP2X1 (K70 et F297 sur zfP2X4) (Marquez-Klaka et al., 2007).

1.2.2. Site de liaison révélé par la structure cristallographie

La résolution de la structure cristallographique avec l'ATP présent dans son site (Hattori and Gouaux, 2012) a, par la suite, non seulement confirmé l'ensemble de ces données expérimentales mais également permis de positionner précisément la molécule vis-à-vis des différents résidus et de comprendre les interactions importantes pour la reconnaissance du ligand. Le site de liaison est donc localisé dans une poche à l'interface entre deux sous-unités, formée par la tête et la partie haute du corps d'une sous-unité et par la nageoire dorsale et la partie basse du corps de la sous-unité adjacente. L'ATP adopte une conformation repliée originale en forme de « U » stabilisée, outre par les résidus de la cavité, par une liaison hydrogène entre l'hydroxyle 2' du ribose et un oxygène du groupement γ-phosphate. La queue triphosphate est impliquée dans des interactions avec les résidus chargés identifiés précédemment, la lysine K70 jouant un rôle crucial car elle interagit avec les atomes d'oxygène des trois groupements phosphate. La lysine 193 semble quant à elle impliquée dans une interaction indirecte via l'hydroxyle d'un glycérol dans la structure, et potentiellement une molécule d'eau dans des conditions physiologiques. L'adénine est bien

reconnue par les résidus L191 et T189 comme le suggérait les résultats expérimentaux de marquage par des dérivés de l'ATP et ceci via des liaisons hydrogènes, mais l'isoleucine I232, non identifiée jusqu'à présent, semble également impliquée. Le ribose est stabilisé par la leucine 217, localisée sur la nageoire dorsale, créant un environnement hydrophobe, l'hydroxyle 3' explore quant à lui le solvant (Figure 2.1).

D'autres études ont pu montrer que l'ATP pouvait également interagir avec des résidus différents, notamment suite au marquage du résidu N140 (rP2X2) par la sonde NCS-ATP (Jiang et al., 2011), suggérant ainsi que la molécule pourrait avoir plusieurs positions dans son site de liaison. Une analyse en modes normaux (NMA) récente suggère l'existence d'au moins trois modes de reconnaissance de l'ATP permis dans la poche (Huang et al., 2014) : outre celui piégé par la structure (AR1), un mode (AR3) composé des résidus W167, I173, L170, D145 et E171 pourrait expliquer les résultats du marquage d'affinité, et un mode (AR2) où le site de contact de l'adénine est plus enfoui (I94,I97, Y295 et F297). Le mode AR1 étant le seul à produire des événements d'ouverture en dynamique moléculaire, il semblerait que les deux autres modes soient impliqués dans la reconnaissance des antagonistes.

1.3. Le domaine transmembranaire

1.3.1. Les hélices transmembranaires

L'analyse des séquences de P2Xs suggéra très tôt la présence de deux domaines hydrophobes suffisamment longs pour traverser la membrane plasmique et de nombreuses études fonctionnelles se sont focalisées sur la caractérisation de ces deux domaines. La substitution systématique des résidus de ces régions en tryptophanes (Silberberg, 2005), cystéines (Egan et al., 1998) ou alanines (Li, 2004) a montré une périodicité compatible avec une organisation en hélice α. En parallèle, l'accessibilité de ces résidus mutés en cystéines à des composés thiol-réactifs a été testée, tout comme leur importance dans la perméabilité calcique du récepteur (Migita, 2001; Samways et al., 2008). La principale conclusion tirée de ces études est le fait que le segment TM1 ne joue pas un rôle crucial dans la perméation des ions et qu'il semble être externe au pore. En effet, excepté pour le mutant V48C (rP2X2), aucune modification des courants n'est observée suite à l'application de $MTSET^+$ en

présence ou non d'ATP (Jiang et al., 2001). Cependant, certains résidus situés aux extrémités des hélices sont accessibles à des composés plus petits tels que l'argent en présence d'ATP (Haines et al., 2001) ou aux MTS suite à une longue exposition (Jiang et al., 2001; Samways et al., 2008). D'autre part, la formation spontanée d'un pont disulfure entre les résidus V48C et I328C (rP2X2) (Jiang et al., 2001, 2003) prouve la proximité spatiale entre les résidus de TM1 et de TM2 dans un état fermé. Les deux structures cristallographiques ont confirmé ces données, TM1 étant situé en périphérie, il semble que ce domaine contribue plutôt à l'ancrage dans la membrane et la stabilisation de la structure. Cependant, l'état ouvert montre une certaine accessibilité des résidus de TM1 proches des fenestrations latérales, ce qui pourrait expliquer les résultats de Haines et de Samways.

Enfin, on a longtemps comparé, malgré l'absence d'identité dans la séquence d'acides aminés, les récepteurs P2Xs et les récepteurs sodiques ASICs sensibles aux protons, certains travaux ayant montré une similarité dans la fonction et dans la topologie des domaines transmembranaires (Paukert, 2004), confirmée dans un premier temps, par la résolution de la structure cristallographique d'un état désensibilisé de ASIC1 (Gonzales et al., 2009). Cependant, la réinterprétation des données structurales récente (Baconguis et al., 2014) a montré que l'hélice TM2 des récepteurs ASIC est discontinue : une séquence GAS de trois acides aminés permet un échange de segments transmembraines entre les sous-unités adjacentes. Or ce phénomène n'a pas lieu sur les récepteurs P2Xs, comme l'indique d'une part la structure (Kawate et al., 2009) et d'autre part des constructions de site de métallation sur des concatémères (Li et al., 2010), qui sont des constructions permettant d'introduire de manière ciblée des mutations sur les différentes sous-unités.

1.3.2. Localisation du pore

De nombreux travaux se sont focalisés sur la caractérisation de TM2 et ont tenté de délimiter le pore de ces récepteurs. La résolution de la structure cristallographique a permis de trancher entre les différentes hypothèses proposées quant à la localisation précise du « gate » suite à des expériences d'accessibilité aux dérivés MTS et aux ions métalliques (Egan et al., 1998; Kracun et al., 2010; Li et al., 2008; Rassendren et al., 1997). La zone de constriction maximale est observée à mi-hauteur de la bicouche lipidique, au niveau du

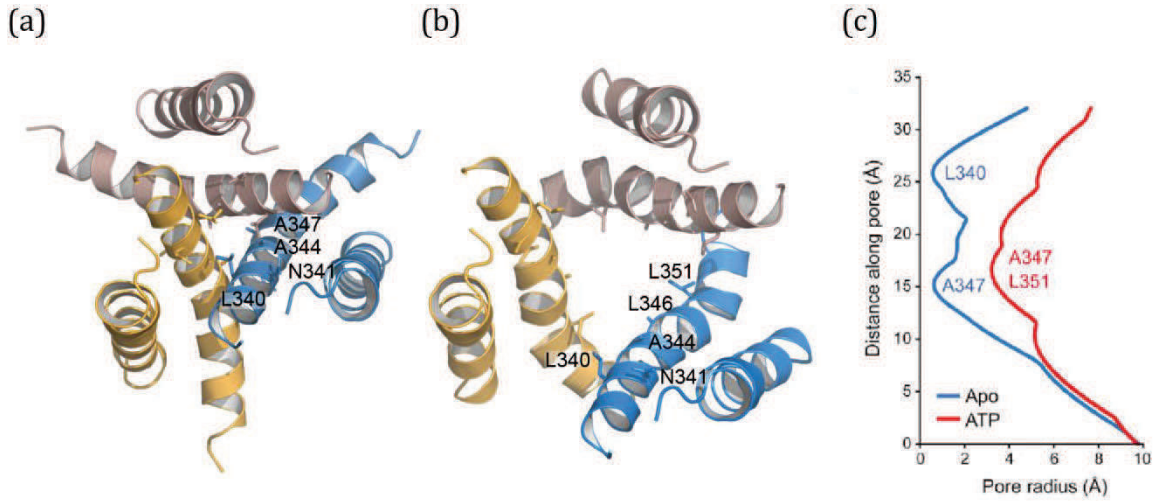


Figure 2.3 : Le pore transmembranaire. (a) vue extracellulaire de l'état fermé de zfP2X4 (b) vue extracellulaire de l'état ouvert de zfP2X4 (c) rayon moyen du pore transmembranaire dans les deux états cristallisés (adapté de Hattori et Gouaux, 2012).

résidu A344 zfP2X4 (T336 sur rP2X2). Le « gate », d'une longueur de 8Å environ, est délimité dans sa partie extracellulaire par les résidus L340 et N341 (I332 et N333 sur rP2X2) et en intracellulaire par les résidus L346 et A347 (L338 et T339 sur rP2X2). La transition vers un état ouvert sera détaillée dans un chapitre ultérieur mais on peut d'ores et déjà noter que les résidus A344 s'éloignent considérablement et que le diamètre du pore ouvert est de 7Å environ (Figure 2.3).

1.3.3. La perméation des ions

Depuis le clonage des récepteurs P2Xs, l'identification des résidus impliqués dans la voie de perméation des ions à travers la membrane a concentré beaucoup d'efforts, principalement par des études de SCAM (pour une revue complète se référer à (Samways et al., 2014)). L'accessibilité des résidus de TM2 a été testée avec différents composés de tailles variables avec des protocoles d'exposition différents, ce qui peut expliquer que l'ensemble des résidus situés entre T336 et F346 (rP2X2) aient été identifiés comme positifs. Par exemple, l'argent, de petite taille, a la capacité de s'insérer dans les petites cavités protéiques qui ne sont pas nécessairement localisées le long du canal, et les temps d'exposition longs peuvent entraîner un marquage des résidus qui ne sont accessibles que dans des conformations explorées rarement par la protéine. Toujours est-il que l'on peut déduire de ces études un certain nombre d'informations qui ont été, par la suite, confirmées par la structure cristallographique. Tout d'abord, les résidus I328C, N333C et T336C peuvent

être modifiés par l'argent, le MTSEA$^+$, le MTSET$^+$ et le MTSES$^-$ en présence et en absence d'ATP : ils bordent la partie extracellulaire du pore. Dans l'état ouvert, T336C est également accessible à des réactifs de grande taille comme le Texas Red-MTSEA$^+$ (Li et al., 2010) ce qui n'est pas le cas de T339C (Li et al., 2010; Rassendren et al., 1997), pourtant accessible aux autres composés chargés positivement, ce qui suggère que ce résidu est dans une zone plus étroite du canal ouvert. Les résidus V343C et F346C sont marqués par l'argent et le MTSET$^+$ et D349C par le MTSEA$^+$, et ces trois résidus coordonnent le cadmium, ils semblent donc border le pore dans la partie intracellulaire contrairement aux résidus L334C, A337 et G344 marqués uniquement par l'argent (Egan et al., 1998; Li et al., 2008, 2010). Le profil du mutant G342C marqué par le cadmium (Kracun et al., 2010), une potentiation plutôt qu'une inhibition des courants ATP, suggère que le marquage n'obstrue pas le pore mais déplace l'équilibre entre les formes fermées et ouvertes du récepteur, en faveur d'une orientation des chaînes latérales de ce résidu en dehors de l'axe central.

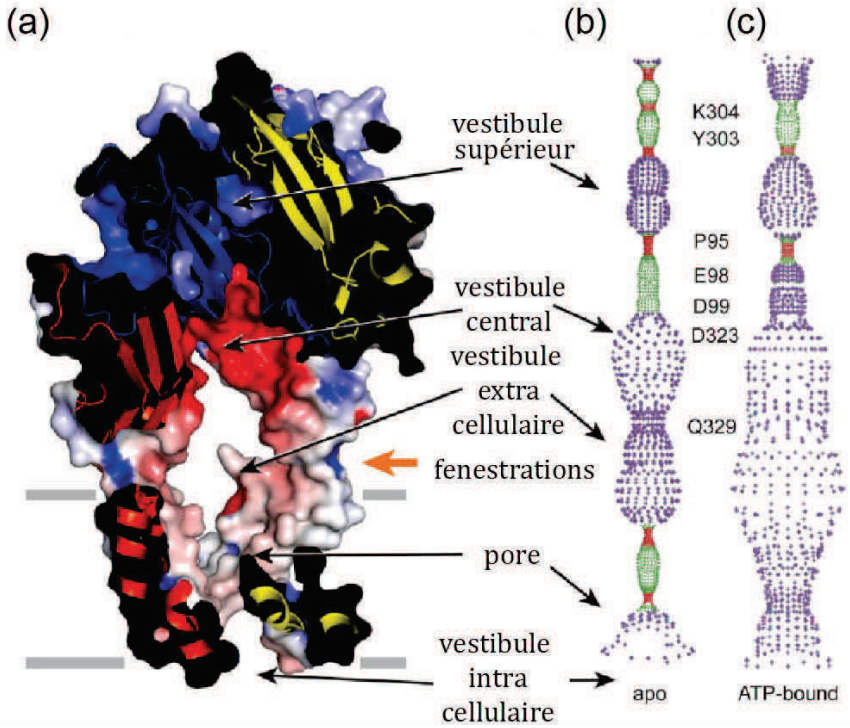


Figure 2.4 : Les vestibules et le pore transmembranaire. (a) Représentation des potentiels électrostatiques de surface de l'état ouvert (rouge -10kT à bleu +10kT) (b) représentation des cavités internes le long de l'axe central du récepteur dans l'état fermé (c) dans l'état ouvert, chaque couleur représente le rayon moyen (rouge < 1.15 Å, vert 1.15–2.3 Å, violet >2.3 Å (adapté de Hattori et Gouaux, 2012).

Intéressons nous maintenant à la sélectivité du récepteur. Outre la contrainte stérique du diamètre du pore, l'environnement électrostatique du canal est déterminant pour les propriétés de perméation des canaux transmembranaires (Samways et al., 2014). La présence de résidus chargés à proximité du gate contribue à la sélectivité car elle induit une répulsion ou une attraction des ions selon leur charge. De plus, les chaînes latérales des acides aminés bordant le canal peuvent contribuer activement au passage des ions en favorisant leur déshydratation par exemple, comme cela a pu être observé sur d'autres canaux ioniques tels que les canaux KcsA (Roux, 1999; Shrivastava and Sansom, 2000).

Pour les récepteurs P2Xs, la sélectivité cationique observée pour l'ensemble des sous-types excepté P2X5, n'est pas encore expliquée. Concernant les fenestrations et vestibules extracellulaires, les résidus chargés identifiés ne semblent pas avoir un rôle déterminant puisque par exemple, E56 et D58 (rP2X4) ne sont pas conservés (deux sérines sur P2X1) et surtout que P2X5, le sous-type qui est perméant au chlore, a également deux acides aspartiques à ces positions. De même, la neutralisation de la lysine 52 (P2X5), dont les résidus homologues sur les autres sous types sont des acides aspartiques, glutamiques ou une glutamine, n'a aucun effet sur la perméabilité chlore (Bo et al., 2003). En outre, l'accessibilité des résidus E56C, T57C, D58C et S59C (rP2X4) aux composés $MTSES^-$ et $MTSET^+$ est similaire (Rassendren et al., 1997; Samways et al., 2011), et le fait que le vestibule central ne soit pas accessible au $MTSES^-$ ne suffit pas à expliquer cette sélectivité cationique. Le canal lui-même pourrait permettre la sélectivité puisque la mutation T339K sur rP2X2 rend le récepteur perméant au chlore (Browne et al., 2011) et T339R inverse la perméabilité (P_{Cl}/P_{Na} ~2) mais ce résidu est peu conservé au sein de la famille. La mutation en lysine des résidus T348 et D352 rP2X7 (S345 et D349 rP2X2) permet également d'augmenter la perméabilité chlore (Browne et al., 2013) mais ils sont situés dans la partie intracellulaire.

Les récepteurs P2Xs sont dits cations non sélectifs car ils ne discriminent pas (ou peu) entre les différents cations. La séquence de perméabilité pour les cations alcalins ($K^+>Rb^+>Cs^+>Na^+>Li^+$) dans un état actif appelé I_1, montre une corrélation entre le rayon de Stokes et la conductance relative (Ding and Sachs, 1999). Le diamètre du pore ouvert prédit par la structure cristallographique à son point le plus contrit est de 7Å (Hattori and Gouaux, 2012), mais le fait que de larges cations comme le $NMDG^+$ ou le YO-PRO1 (Khakh et al., 1999a; Virginio et al., 1999) puissent également passer à travers le pore suppose une flexibilité. La perméabilité au calcium est variable entre les différents sous-types, P2X3 étant

le moins perméant (Egan and Khakh, 2004; Samways and Egan, 2007). Il semblerait que les résidus polaires T336, T339 et S340 rP2X2 bordant le canal soient importants car leur substitution par des résidus hydrophobes ou plus encombrants (T339Y, S340Y) (Egan and Khakh, 2004; Migita, 2001) diminue la sélectivité calcique par rapport au sodium. Pour T336, les résidus homologues sur les autres sous-types sont des tyrosines ou des sérines excepté pour P2X3, ce qui semble confirmer l'hypothèse que la chaîne latérale de ce résidu soit en interaction étroite avec les cations qui transitent par le pore, et permet peut être un passage facilité du calcium. Au niveau intracellulaire, un acide aspartique est conservé (D349 sur rP2X2) mais sa substitution n'a pas d'effet sur les perméabilités relatives (Migita, 2001). Cependant, sur le sous-type d'Ostreococcus *tauri l*e résidu homologue est une asparagine et la remplacer par un acide aspartique permet d'augmenter la perméabilité calcique de façon substantielle (~50%) (Fountain et al., 2008).

Toutes ces données semblent indiquer que ne le filtre de sélectivité de ces récepteurs n'est pas situé à un endroit précis ou du à des résidus particuliers, la conductance semble être plutôt régulée de manière diffuse le long de la voie de perméation.

1.4. Les voies d'accès extracellulaires

Au vu de la structure de l'état fermé de zfP2X4, deux voies d'accès au canal ionique semblent possibles : une le long de l'axe central du récepteur, formée par une succession de cavités désignées comme les vestibules supérieur, central et extracellulaire, et l'autre, proche de la membrane, formée par trois fenestrations ouvertes sur le milieu extracellulaire. De nombreuses expériences d'accessibilité des résidus ont permis de privilégier l'hypothèse d'un accès latéral des ions, permis par un diamètre de 12Å (Figure 2.4). Le marquage, en présence ou non d'ATP, de résidus bordant ces fenestrations, par exemple E56C et D58C sur rP2X4, G60C, G321C sur rP2X1, ou K53C, S54C et L327C sur P2X2, avec des composés tels que des dérivés de MTS chargés positivement, conduit à une inhibition des courant ATP réversible après application de DTT (Kawate et al., 2011; Samways et al., 2011). En revanche, la formation d'un pont disulfure obstruant le vestibule central n'a pas d'influence sur le flux d'ions induit lors de l'ouverture du canal (Kawate et al., 2011), de même que la présence de gadolinium qui n'abolit pas les courants ATP, ce qui est en faveur d'un point d'entrée des ions situé en dessous de ce domaine. De plus, les résidus du vestibule supérieur, sont plus

accessibles au solvant en absence d'ATP qu'en sa présence (Roberts et al., 2012). L'état ouvert décrit par Gouaux (Hattori and Gouaux, 2012) prédit une expansion notable des fenestrations latérales alors que la voie centrale est trop étroite pour permettre un passage continu des ions avec un point de constriction à la sortie du vestibule supérieur, alors isolé. Le vestibule central possède une surface globalement négative, accessible principalement aux molécules chargées positivement, et il ne forme qu'une seule cavité avec le vestibule extracellulaire dans l'état ouvert. Des travaux récents montrent également que les ions peuvent entrer dans le vestibule extracellulaire par le biais des fenestrations dans l'état fermé (Rokic et al., 2014).
Ces résultats démontrent ainsi que les fenestrations latérales constituent le point d'entrée des ions qui vont alors être concentrés au niveau du vestibule extracellulaire grâce à des résidus situés au-dessus de TM1. Les résidus de TM2 semblent quant à eux faciliter l'accès au pore.

Dans la mesure où il n'existe aucun modèle homologue à ces récepteurs, la résolution de la structure de l'état fermé a ainsi été une étape clé, néanmoins les informations structurales alors obtenues ont en fait confirmé un grand nombre de données expérimentales déduites auparavant grâce à d'autres techniques. La résolution de la structure d'un état ouvert a quant à elle été déterminante dans la mesure où elle a permis une compréhension du mécanisme de liaison du ligand dans son site et a ainsi ouvert la voie au développement d'une pharmacologie rationnelle en permettant, pour la première fois, le docking des molécules dans leur site. De plus, elle a fourni des informations essentielles quant au transit des ions et aux réarrangements structuraux nécessaires au fonctionnement des récepteurs P2Xs.

2. Le phénomène de gating

L'apport de la cristallographie aux rayons X à la biologie dans l'exploration structurale est inestimable dans la mesure où cette technique a permis d'accéder à une compréhension moléculaire du fonctionnement des protéines en servant de base aux études structure-fonctions. Elle offre l'énorme avantage d'accéder à la structure en trois dimensions de la

protéine, figée dans une conformation donnée, et ceci avec une résolution de quelques angströms permettant de distinguer les atomes des différents résidus. La comparaison des structures de différents états conformationnels permet de mettre en exergue les régions clés de la protéine impliquées dans l'ouverture du récepteur. Couplée aux autres techniques d'exploration mécanistique des transitions allostériques, elle permet de disséquer à une échelle moléculaire le fonctionnement des récepteurs et d'intégrer la notion de dynamique dans les systèmes étudiés. Outre toutes ces techniques expérimentales, des approches *in silico* de prédictions des mouvements ont été développées et sont maintenant complémentaires des techniques classiques d'exploration. Elles permettent d'une part, d'identifier des mouvements jusqu'alors insoupçonnés et d'autre part, de tester la pertinence des hypothèses émises suite à l'exploration fonctionnelle et de formaliser les modèles. Cette section a pour objectif de faire la synthèse des informations obtenues en les replaçant dans le contexte du gating du récepteur P2X.

2.1. Les mouvements de la tête et des nageoires de l'ectodomaine

Au sein des deux autres familles de LGICs, un mouvement de fermeture du site de liaison autour de l'agoniste a pu être identifié : la comparaison de structures de l'AChBP, une protéine soluble modèle du domaine LBD des récepteurs nicotiniques, en présence d'agoniste (épibatidine) ou d'antagoniste (α-conotoxine) met en évidence un mouvement de la boucle C relativement à la boucle F d'une amplitude 11Å entre les 2 positions extrêmes (Hansen et al., 2005); sur les récepteurs iGluR, le glutamate induit une fermeture entre les domaines D1 et D2 du NTD et le degré de fermeture est corrélé à l'efficacité des agonistes (Armstrong and Gouaux, 2000). Sur les récepteurs P2Xs, de nombreuses évidences d'un mouvement de fermeture de la mâchoire bordant le site de liaison de l'ATP ont été accumulées.

2.1.1. Fermeture de la mâchoire

Les premières preuves de ce mouvement ont été fournies par la perte de la potentiation par le zinc des courants ATP suite à la mutation des résidus H120 et/ou H230 (rP2X2) en alanine, ainsi que par la formation d'un pont disulfure entre ces résidus mutés en

cystéine qui entraîne une perte de la réponse à l'ATP réversible par l'application d'un agent réducteur tel que le DTT (Nagaya, 2005). L'introduction ciblée de cystéines et la formation du pont qui s'ensuit permet de bloquer la protéine dans une conformation donnée s'il s'agit d'une région charnière dans la transition allostérique ciblée et de démontrer un mouvement relatif entre deux résidus, ce qui est le cas ici. Par la suite, Tittle a pu montrer une certaine tolérance dans la position de ce site de liaison du zinc, formé par les résidus de deux sous-unités adjacentes, suggérant une flexibilité autour de ces résidus (Tittle et al., 2007). La structure de l'état fermé montre certes, une proximité de ces résidus dont les chaines latérales pointent l'une vers l'autre, mais la distance prédite (17Å entre les C_β) est trop importante pour former le site de chélation du zinc ou un pont disulfure, ce qui suggère un rapprochement de ces résidus suite à la liaison de l'ATP. Ce rapprochement a, par la suite, été prédit par des méthodes de simulations comme l'analyse en mode normaux (NMA) (Jiang et al., 2012). Il s'agit d'une des techniques *in silico* les plus utilisées pour investiguer des mouvements globaux de domaines protéiques et la flexibilité conformationnelle de protéines. Elle consiste à apporter de l'énergie sous forme de chaleur au système étudié, et d'observer les mouvements qui se dégagent suite à une analyse harmonique. Chaque atome du système défini par des coordonnées peut osciller autour de sa position d'équilibre. Les modes normaux (vibration) avec la plus grande fluctuation (mode de fréquence le plus bas) sont les plus pertinents. Etant donné le nombre d'atomes présents dans une macromolécule, la stratégie utilisée pour l'étude des protéines passe par une simplification du système où chaque résidu est représenté par son atome C_α : on crée alors un réseau élastique (Elastic Network Model) où chaque liaison du squelette est assimilée à un ressort et dont la distance à l'équilibre est celle d'énergie la plus faible. Les coordonnées des atomes sont fournies par les fichiers PBD suite à la résolution des structures cristallographiques. En utilisant un modèle homologue de rP2X2 basé sur la structure cristallographie de l'état fermé zfP2X4, les auteurs ont « docké » l'ATP dans le site putatif en se basant sur les données disponibles de proximité de résidus avec les différentes parties de la molécule. La présence de l'ATP a permis l'exploration de modes normaux jusqu'alors trop coûteux en énergie et l'identification d'un mouvement de la tête qui vient se rapprocher de la nageoire dorsale de la sous-unité adjacente. Ces résultats préliminaires ont par la suite été confirmés par l'ingénierie du site zinc et des tests électrophysiologiques : l'introduction de la mutation T339S, connue pour induire des événements d'ouverture spontanée, permet d'obtenir un

récepteur capable d'être activé par la présence de zinc en absence d'ATP, ces résultats montrent ainsi que l'ouverture du canal est corrélée à la fermeture de la mâchoire bordant le site de liaison de l'ATP (Jiang et al., 2012).

Des images obtenues par microscopie électronique à transmission montrent également une rotation de la tête de chaque sous-unité en présence d'ATP, ce qui implique un mouvement de fermeture autour du site de liaison (Roberts et al., 2012). Ce mouvement est suggéré par les résultats de VCF obtenus sur les mutants G115C et G124C, localisés sur la tête de rP2X1, marqués par la sonde fluorescente TMRM : si l'application d'ATP induit une augmentation de fluorescence, ce n'est pas le cas pour l'application de TNP-ATP, ce qui suggère que ces résidus n'interagissent pas directement avec le ligand, qu'ils sont en mouvement lors de l'ouverture du canal et que la présence d'un antagoniste empêche ce mouvement (Lörinczi et al., 2012). La résolution de la structure d'un état où l'ATP est liée dans son site a définitivement confirmé ce phénomène en montrant un rapprochement de la tête et de la nageoire dorsale (Figure 2.5).

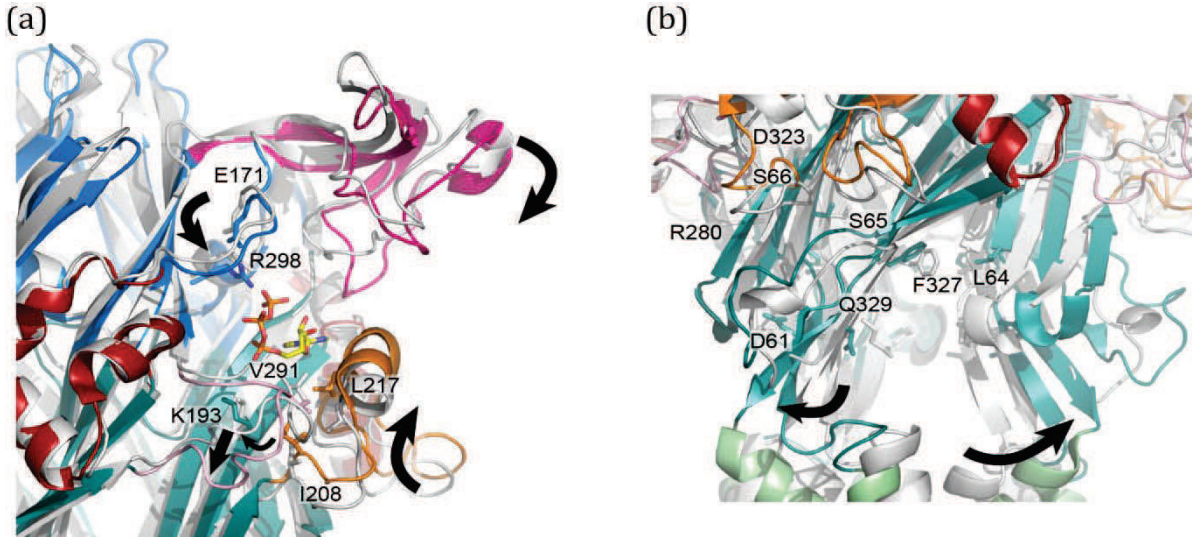


Figure 2.5 : Réarrangements structuraux lors du phénomène de gating. (a) superposition des structures cristallographique de l'état fermé (gris) et ouvert (coloré) du site de liaison (b) et du corps inférieur du récepteur zfP2X4. Les résidus indiqués dans le panel b sont impliqués dans des ponts disulfures intra et inter sous-unités ingéniérés dans la partie basse du corps du récepteur. Les flèches noires représentent les mouvements significatifs qui semblent avoir lieu lors de l'ouverture du canal suite à la liaison de l'ATP.

2.1.2. Mouvement des feuillets et boucles bordant le site de liaison

Le challenge actuel est de disséquer le mécanisme de gating de la manière la plus précise possible et pour ce faire, de nombreuses simulations de NMA et de dynamique moléculaire sont réalisées afin d'identifier des transitions non prédites par les méthodes fonctionnelles. La différence fondamentale entre les techniques de NMA et celles de simulation de dynamique moléculaire est la variable de temps. Dans ces dernières, on prédit l'évolution d'un ensemble de particules soumises à des conditions de pressions et températures définies. A chaque pas de temps, la position et la vitesse de chacun des éléments du système sont calculées à partir des forces d'interaction des particules. Cette approche est coûteuse en temps de calcul et nécessite un traitement préalable du système observé afin d'optimiser toutes les conditions, notamment le champ de force, et l'environnement de la protéine.

Mouvement vers le bas de la nageoire gauche

Ces simulations, réalisées tout d'abord à partir de la structure de l'état fermé, montrent un mouvement naturel de la tête du récepteur vers le bas et des boucles de la nageoire dorsale (DF) et gauche (LF) vers le haut en l'absence d'ATP et que cette dynamique est essentielle à la liaison du ligand et à l'activation du récepteur.

L'introduction du ligand dans ces simulations montre une rupture de ce mouvement et entraîne des changements d'interactions qui induisent des mouvements différents, expliquant pourquoi, malgré la fermeture de la mâchoire, les simulations précédentes ne montrent pas d'ouverture du canal (Zhao et al., 2014).

La première différence observée est le mouvement vers le bas de la nageoire gauche (LF), mouvement également identifié sur la structure cristallographique. La validité de cette hypothèse a été testée par la création d'un pont disulfure entre les résidus des résidus de LF et de DF. Dans l'étude de Zhao, les courants ATP inhibés par le pont V288C (LF) /211C (DF) rP2X4 (V291C et S214C zfP2X4) sont restaurés par la présence de DTT. De plus, l'affinité apparente pour l'ATP est diminuée (~5 fois) par la formation de ce pont et l'application de DTT potentialise un courant ATP saturant. Ces résultats sont en faveur d'un rôle pivot essentiel de ce mouvement relatif de LF et DF dans l'activation du récepteur.

Il semble donc que la liaison de l'ATP entraîne un changement des interactions entre les résidus de ces deux domaines. La comparaison des deux structures montre que certains résidus hydrophobes I217, I208, V291 et la lysine K193 (zfP2X4) relativement conservés au sein des différents sous-types de P2X, subissent un changement d'orientation dans cette région et que leurs interactions les uns avec les autres soient modifiées. Les simulations de dynamique moléculaire montrent que la présence de l'ATP induit un éloignement de V291 et un rapprochement des résidus K193, L217 et I208 autour de l'ATP (Zhao et al., 2014) (Figure 2.5). L'introduction de chaînes latérales hydrophiles ou encombrantes sur les résidus homologues de rP2X4 diminue fortement les courants ATP, ce qui n'est pas le cas pour les résidus voisins. Ces résultats démontrent que la liaison de l'ATP entraîne un changement des interactions hydrophobes qui permet de diminuer la barrière énergétique menant à l'activation du récepteur.

Réorganisation de la partie supérieure de la poche de liaison

Une autre étude a également montré que l'ATP pouvait adopter trois « pauses » différentes dans son site de liaison et que le mouvement naturel de fermeture de la mâchoire favorisait celle piégée par la structure cristallographique (Huang et al., 2014). La réorientation du résidu R143 et le rapprochement des boucles 139-146 (vers la gauche) et 169-183 (vers la droite) situées sur la partie interne supérieure de la mâchoire est alors essentielle pour orienter l'ATP de façon à favoriser l'ouverture du canal, c'est-à-dire selon le mode AR1.

Transmission du mouvement au corps du récepteur

Avant la résolution des structures de P2Xs, les deux lysines K70 et K316 (zfP2X4) avaient été identifiées par des études fonctionnelles comme étant essentielles à la liaison de l'ATP et/ou au phénomène de gating puisque leur mutation entraîne une perte de la réponse à l'ATP (Jiang et al., 2000). L'ingénierie de doubles mutants K69A/T339S et K308/T339S (rP2X2) a permis de distinguer le rôle charnière dans le gating du résidu K308 (K316 zfP2X4) du rôle de coordination de l'ATP de K70 (Cao et al., 2007). Par la suite, une analyse en mode normaux couplée à des simulations de dynamique moléculaire ont prédit que la partie supérieure du feuillet β1 (portant le résidu K70 impliqué dans la reconnaissance de l'ATP) et le feuillet β14 lié à la partie charnière pré-TM2 (portant K316) se rapprochaient avec des

mouvements de rotation inversés (Figure 2.6), ceci ayant pour conséquence un rapprochement autour du site de l'ATP de ces feuillets et une expansion de leurs extrémités basses compatible avec une ouverture du canal (Du et al., 2012). Au vu de la perte complète de fonctionnalité suite à la mutation de K316, le mouvement de β14 semble donc essentiel pour l'ouverture du canal.

De plus, les nageoires dorsale et gauche étant couplée à la partie inférieure du corps du récepteur assez rigide, elles agissent comme des leviers. L'ingénierie de ponts disulfures verrous de transitions conformationnelles entre les feuillets de sous-unités adjacentes suggère un éloignement relatif de la nageoire droite et du haut du corps du récepteur mis en évidence par le pont K190C/N284C (hP2X1) et de la tête de sous-unités adjacentes par le pont K138C/E181C (hP2X1) (Roberts et al., 2012).

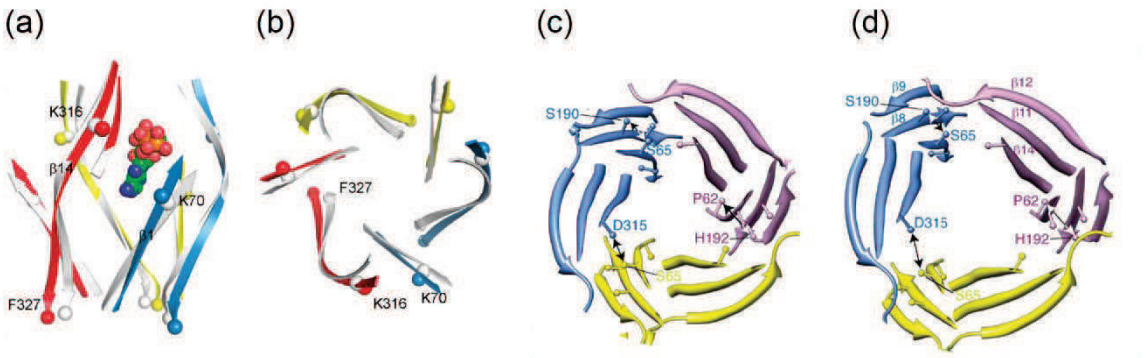


Figure 2.6 : Mouvements des feuillets au sein du corps du récepteur. (a) superposition des feuillets de la structure cristallographique de l'état fermé avant (gris) et après simulations de dynamique moléculaire (bleu, jaune, rouge) suite à l'introduction d'une molécule d'ATP dans le site de liaison, vue parallèle à la membrane (b) vue de la partie extracellulaire. (c) Ponts disulfures intra et inter sous-unités ingéniérés dans la partie basse du corps du récepteur représentés sur les structures cristallographiques de l'état fermé et (d) de l'état ouvert (adapté de Du et al., 2012 et Stelmashenko et al., 2014).

2.2. Les mouvements des feuillets extracellulaires

Du fait de la certaine rigidité du corps supérieur du récepteur due à l'organisation des feuillets β entre eux et aux nombreux contacts inter sous-unités, cette partie du récepteur se comporte comme une seule entité et les feuillets au sein d'une même sous-unité bougent de façon concertée. Le corps inférieur est formé quant à lui par les feuillets β1 et β8 reliés à TM1 et 3 feuillets connectés à TM2 (β11, β12, β14) reliés par des linkers

flexibles. De plus, les contacts entre les sous-unités sont plus restreints que dans la partie supérieure permettant une flexibilité de ce domaine clé dans la transmission du mouvement d'ouverture au canal.

2.2.1. Mouvements de la partie inférieure du corps du récepteur

De nombreux ponts disulfures ont été ingénierés suite à la résolution de la structure cristallographique de 2009, dans le but d'explorer les mouvements relatifs entre résidus situés à l'interface entre les sous-unités qui ont lieu lors du gating et ainsi de déterminer les régions clés dans la transmission de la force d'ouverture. Le mouvement relatif d'éloignement entre les résidus du feuillet β1 et ceux du feuillet β14 est déterminant puisque le pontage sur différents sous types I62C/D320C (hP2X1) (Roberts et al., 2012), E59C/Q321C (rP2X2) (Kawate et al., 2011) et S65C/D315C (rP2X2) (Stelmashenko et al., 2014) induit une forte diminution de la réponse ATP qui est restaurée par l'application de DTT. L'éloignement concerté des feuillets est suggéré par l'effet similaire du pontage des cystéines introduites soit sur le feuillet β1 (I62C hP2X1) ou soit sur le feuillet β8 (P196C hP2X1) avec celle introduite sur le feuillet β14 (D320C hP2X1) (Roberts et al., 2012). Cependant, fixer la distance entre β1 et β8 diminue également le gating (S65C/S190C rP2X2), (Stelmashenko et al., 2014) ce qui suppose que dans cette région, le mouvement d'éloignement entre les sous-unités est, certes, déterminant mais qu'il y a une flexibilité au sein même de la sous-unité (Figure 2.6).

L'importance de cette région « levier » avait déjà été suggérée par les travaux de Young qui montrait l'importance de la région pré-TM2 conservée R304-I314 (rP2X2) pour la conformation correcte du récepteur et donc sa fonctionnalité : la substitution en cystéines des résidus de ce domaine induit une perte de fonction corrélée à un défaut de glycosylation de D298 (Young et al., 2008b). Yan a montré également l'importance du segment G316-I333 (rP2X4) dans la transduction du signal avec un mouvement vertical de cette région. La mutation en alanine du résidu G316 (G311 rP2X2) induit une diminution de la sensibilité à l'ATP (~17 fois), une augmentation du temps d'activation et un retard dans la désensibilisation alors que la mutation de ce même résidu en proline n'entraîne pas de variation d'affinité apparente pour l'ATP mais uniquement des variations de cinétique (Yan et al., 2006). Ce résidu ne joue donc pas un rôle critique dans le gating mais semble plutôt

être une charnière de flexibilité de cette région. Enfin, un pont salin important pour la stabilisation de l'état fermé a été mis en évidence par une méthode de substitution successive (Jiang et al., 2010). Sachant qu'un pont salin résulte de l'interaction électrostatique entre deux groupements chimiques de charge opposée, typiquement entre un résidu lysine ou arginine et un acide aspartique ou glutamique et que cette interaction forte et assez rare, permet de stabiliser la protéine, l'interversion des acides aminés impliqués ne doit pas induire de changement majeur sur la fonction du récepteur, la mutation successive de l'un ou l'autre par contre doit créer une répulsion électrostatique qui déstabilise la conformation de la protéine. Au sein de l'ectodomaine de P2X, alors que la double mutation E63K/R274E ne change pas l'affinité apparente pour l'ATP, les mutations isolées E63K et R274E entraînent un gain de fonction du récepteur. Ce pont salin entre les feuillets β1 et β12 donc à l'interface entre la boucle connectée à TM1 et celle connectée à TM2 de la sous-unité adjacente, stabilise l'état fermé et régule l'efficacité du gating (Jiang et al., 2010).

2.2.2. Mouvements de la partie supérieure du corps du récepteur

Au niveau supérieur, la comparaison des deux structures cristallographiques montre une expansion du volume des vestibules supérieur et central, tout en gardant un point de constriction entre les deux au niveau du résidu conservé P95 (zfP2X4) (Figure 2.4). Des expériences de SCAM ont montré que le vestibule supérieur était plus accessible en absence d'ATP qu'en sa présence. On peut donc supposer que la rotation descendante de la tête du récepteur ferme l'accès de ce vestibule à ces deux extrémités.

On remarque également une dilatation de l'anneau entre le vestibule central et le vestibule extracellulaire, qui confirme les expériences de SCAM précédemment réalisées. Elles montraient en effet que le marquage des résidus G60C et F195C (hP2X1) par un dérivé chargé positivement MTSET entraînait une augmentation des courants ATP et ainsi qu'une augmentation de sensibilité à l'ATP (Allsopp et al., 2011). De plus, la mutation F95L sur (hP2X7) (I94 zfP2X4), un résidu du vestibule central induit une diminution de la sensibilité à des antagonistes non compétitifs : l'effet du modulateur allostérique GW791343 varie en fonction de la nature du résidu en position 95 (Michel et al., 2008). Lorsqu'il s'agit d'une leucine comme sur le sous type de rat, le composé est un modulateur allostérique positif,

c'est-à-dire que l'ouverture du canal est favorisée. Lorsque ce résidu est une phénylalanine, le composé est un modulateur allostérique négatif. Introduire une leucine sur le sous type hP2X7 (F95L) permet d 'inverser en partie le profil de ce composé. La phénylalanine étant un résidu encombrant, on peut émettre l'hypothèse qu'elle diminue la flexibilité de cette région et donc influe sur le phénomène de gating.

Pour résumer, le mouvement de la nageoire dorsale (α3 principalement) tire le corps inférieur vers l'extérieur, le mouvement conjoint des nageoires dorsales et gauches tire vers le haut les régions linkers proches de la membrane, et le mouvement de la tête entraîne une expansion du vestibule supérieur. Ces mouvements ont une répercussion sur l'ensemble de la structure : les vestibules internes s'élargissent tout en gardant un point de constriction entre le vestibule supérieur et le vestibule central, et les hélices transmembranaires entament leur rotation permettant une ouverture telle un diaphragme.

2.3. Les mouvements des segments transmembranaires

Avant la résolution de la structure cristallographique de l'état fermé, de nombreuses études de mutagénèses sur les segments TM1 et TM2 ont été conduites dans le but d'identifier les résidus bordant le pore et formant le gate. Au cours de ces études, il est apparu que certains résidus subissaient des changements d'orientation ou d'accessibilité lors de l'application d'ATP, ce qui a permis de proposer quelques hypothèses concernant le mouvement des hélices au cours de l'ouverture du canal. Les résultats obtenus sur le mutant V48C (rP2X2) avec un marquage au $MTSET^+$ ou au MTSM montrent clairement une augmentation de l'accessibilité de ce résidu en présence d'ATP (Jiang et al., 2001). Corrélés à la formation d'un pont disulfure entre I328C et V48C (rP2X2) qui bloque l'ouverture optimale du canal (Jiang et al., 2003), ces résultats préliminaires démontraient une réorganisation de la partie supérieure des hélices l'une par rapport à l'autre. La substitution systématique des résidus de ces hélices en tryptophane, dont la chaîne latérale est encombrante, a permis de discriminer les résidus de TM1 situés à l'interface entre les deux hélices de ceux en contact avec les lipides : l'augmentation importante (~4-24 fois) de l'affinité apparente pour l'ATP sur certaines mutants (N32W, Q36W, I39W, Y42W, V43W, I44W, G45W rP2X4) marque une perturbation de l'équilibre canal fermé/ouvert en défaveur de l'état fermé due à une

modification des contacts interhélices, les résidus identifiés doivent être à l'interface entre les deux hélices dans l'état fermé (Silberberg, 2005). La même équipe a, par la suite, observé l'effet d'une application d'ivermectine, un potentiateur allostérique de P2X4 supposé interagir avec les deux segments transmembranaires à l'interface lipide-protéine, sur l'ensemble de ces mutants tryptophane afin d'identifier les résidus en contact avec les lipides dans l'état ouvert. Une faible potentiation des courants ATP par l'ivermectine met en évidence un contact du résidu (V28, I39, Y42, V43, V47 rP2X4) avec les lipides dans l'état ouvert. La comparaison des résultats de ces deux études a permis de proposer une rotation de l'hélice TM1 sur elle-même dans le sens horaire lors du phénomène de gating (Silberberg et al., 2007).

Par la suite, les résultats des études fonctionnelles ont pu être interprétés au regard de la structure de l'état fermé (Kawate et al., 2009). Cao a proposé entre autre, que le résidu S340 (rP2X2) sur lequel l'introduction d'une chaîne positive ou la substitution en lysine ou en acide glutamique, modifie les propriétés du canal ouvert doit être important dans le phénomène de gating. Il suggère une rotation de TM2 dans le sens antihoraire d'une dizaine de degré lors de l'ouverture (Cao et al., 2009) (Figure 2.7). Une avancée importante dans l'exploration des mouvements des hélices transmembranaires est due à l'ingénierie de site de métallation dans leurs parties intracellulaires. Cette méthode se base sur la possibilité de coordonner les petits cations divalents labiles tels que Cu^{2+}, Cd^{2+} et Zn^{2+} par les atomes donneurs (S, O ou NO_2) des chaînes latérales d'acides aminés. La géométrie de coordination est tétraédrique (excepté pour le cadmium qui peu adopter une coordination octaédrique) et les acides aminés impliqués sont dans la majeure partie des cas les histidines et les cystéines. La longueur de la liaison résidu-métal est proche de 2,5Å lorsqu'il s'agit du cadmium et 2,2Å dans le cas du zinc (Rulíšek and Vondrášek, 1998). On peut ainsi créer artificiellement un site de coordination métallique et observer les effets de l'application de l'ion métallique. Kracun a d'abord montré qu'en présence d'ATP, la co-application de cadmium inhibait les courants ATP sur les mutants V343C rP2X2 (L351 zfP2X4) D349C et L353C, suggérant un rapprochement de ces résidus lors de l'ouverture du canal, les résidus V343 dans l'état fermé étant éloignés de ~18Å (Kracun et al., 2010). Li a caractérisé cette interaction grâce à des concatémères : il démontre que les résidus V343 issus des trois hélices TM2 participent à la coordination du cadmium. Il décrit également la formation d'un site entre deux S345C et une H33 (Li et al., 2010). Dans la même étude, il explore la variation

d'accessibilité à l'argent des résidus transmembranaires de TM1 et TM2 suite à l'application d'ATP. Tous ces résultats lui permettent de proposer un premier modèle des mouvements ayant lieu lors du gating : un redressement important des hélices TM2 permet à la fois une expansion du pore et un rapprochement des parties intracellulaires du canal, il implique une modification substantielle des interactions inter sous-unités puisque dans l'état fermé, ce sont presque exclusivement les résidus de TM2 qui sont en contact dans cette région.
Par ailleurs, la possibilité de changer la sélectivité cationique du récepteur rP2X2 pour qu'il présente une perméabilité au chlore par l'introduction d'une lysine en position 339 rP2X2 (A347 zfP2X4), a été exploitée pour démontrer que le mouvement d'ouverture du canal implique conjointement les trois sous-unités, et ceci de manière symétrique (Browne et al., 2011) : les concatémères ayant une, deux ou trois lysines ont une perméabilité chlore qui augmente progressivement.

La résolution de la structure cristallographique de l'état ouvert (Hattori and Gouaux, 2012) a alors permis de préciser le mouvement de passage de l'état fermé à un état ouvert. L'ouverture du canal est similaire à celle d'un diaphragme (« iris- like expansion ») et implique une rotation antihoraire autour de l'axe perpendiculaire à la membrane de ~10° pour TM1 et ~55° pour TM2 associée à un léger redressement (~8° pour TM1 et ~2° pour TM2). Le diamètre du pore augmente alors de 3Å. Au sein de TM2, il semble y avoir une certaine flexibilité autour du résidu G350 (Figure 2.7). De manière surprenante, on remarque une rupture des contacts intra et inter sous-unités au sein du domaine transmembranaire dans cette structure et la présence de larges cavités entre les hélices.

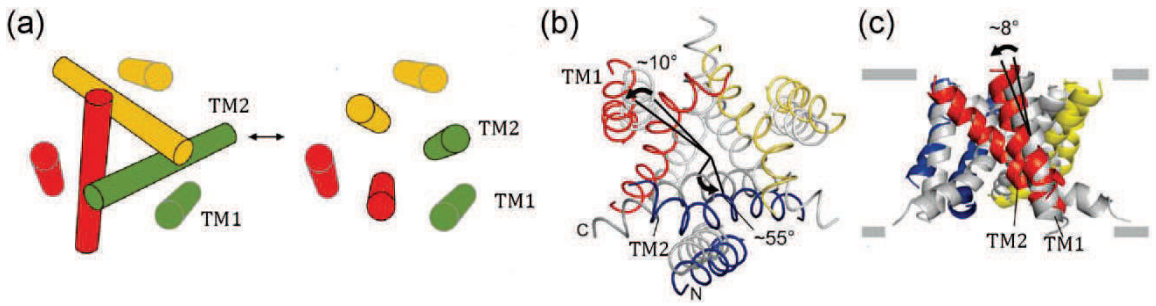


Figure 2.7 : Mouvements des domaines transmembranaires. (a) Représentation du mouvement probable des hélices transmembranaires proposé par Li et al., 2010, vue de la partie extracellulaire. (b) Superposition des domaines transmembranaires des états fermé (gris) et ouvert (coloré) vu du milieu intracellulaire (c) vue parallèle à la membrane (adapté de Hattori et Gouaux, 2012 et Li et al., 2010).

Depuis, de nombreuses simulations on été faites sur P2X afin de comprendre le phénomène de gating dans son ensemble et d'identifier toutes les transitions charnières impliquées. Or, en partant de cette structure, les simulations de dynamique moléculaire aboutissent à une occlusion du canal par l'entrée de lipides via de larges crevasses au sein de la membrane et l'absence d'interactions entre les segments transmembranaires produit une structure instable. Certaines réserves peuvent ainsi être émises quant à la pertinence physiologique de ces données structurales. En effet, le protocole de cristallogenèse implique l'utilisation de détergents pour solubiliser la protéine, or les lipides membranaires jouent un rôle fondamental dans la stabilisation des domaines transmembranaires et donc dans celle de l'architecture globale. De plus, les concentrations nécessaires en protéines et en ligand sont loin des conditions physiologiques, ce qui peut créer des artefacts. Le réseau cristallin peut, par sa nature même, favoriser des conformations inusuelles ou des déformations. Enfin, différentes modifications de la protéine ont été nécessaires pour permettre la formation de cristaux ou améliorer la résolution, notamment une troncature des extrémités intracellulaires et des mutations de certains sites de glycosylation, ce qui peut induire des changements structuraux non négligeables. Si la structure de l'état fermé semble pertinente, l'état présenté comme l'état ouvert est, quant à lui, plus controversé. En effet, outre ces crevasses et le fait que la longueur des domaines transmembranaires soit trop courte pour traverser une membrane physiologique, certaines données fonctionnelles ne peuvent être expliquées par la structure de 2012, en particulier dans le domaine intracellulaire du pore, par exemple les ponts cadmium formés par les résidus V343C ou D349C où les distances prédites entre ces résidus sont de ~13 et ~19Å.

Suite aux sites de métallation créés auparavant et à l'investigation d'un site cadmium créé au sein d'une même sous-unité entre les résidus H33, S345C et C348 (rP2X2), un nouveau modèle de l'état ouvert a été proposé créé par une rotation de ~5° dans le sens antihoraire et un déplacement léger (1,3Å) de l'hélice TM2 vers le centre du canal par rapport à la structure cristallographique (Heymann et al., 2013). Ce modèle, plus compact, mais dont le pore reste ouvert (Figure 2.8) permet de recréer les interfaces suggérées par les études fonctionnelles (Y45 et L340 dans la partie extracellulaire, L351, I355 et W358 avec L346, A347 et V354 dans la partie intracellulaire zfP2X4) et semble donc plus pertinent.

Néanmoins, il est issu de données *in silico*, même s'il concilie certaines données expérimentales et sa validité reste à prouver.

Ainsi, malgré l'avancée considérable qu'a permis la cristallographie dans la connaissance de cette famille de récepteurs, il est nécessaire d'interpréter ses données avec précaution et de combiner les résultats obtenus par les autres techniques pour proposer un modèle de transition entre différents états allostériques qui soit pertinent.

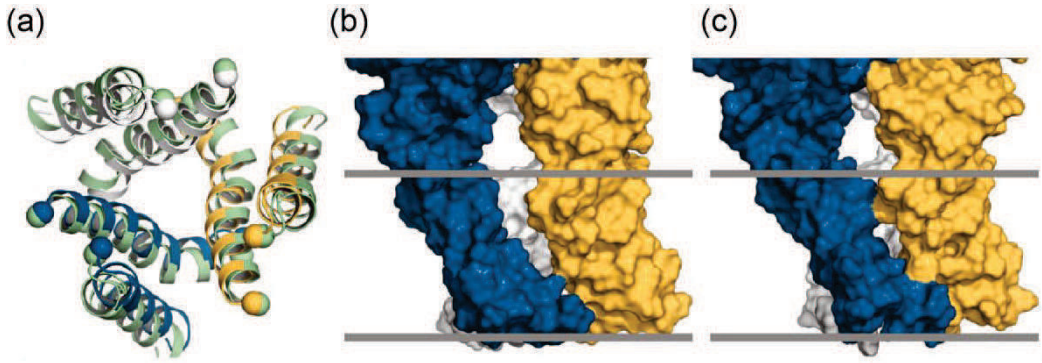


Figure 2.8 : Modèle amélioré de l'état ouvert par Heymann et al. (a) superposition des domaines transmembranaires de la structure cristallographique (vert) et du modèle de Heymann et al. (bleu, jaune, gris), vue de la partie extracellulaire. (b) Représentaion des interfaces entre deux sous-unités adjacentes sur la structure cristallographique et (c) sur le modèle, vue latérale (Heymann et al., 2013).

2.4. Les mouvements des domaines intracellulaires

Contrairement aux autres domaines de la protéine, les segments intracellulaires sont encore peu caractérisés du fait de leur flexibilité. De plus, les structures ont été obtenues à partir de récepteurs tronqués dans les parties intracellulaires et dont 2 sites de glycosylation sont abolis (ΔN27/ΔC24/N78K/N187R). Ces constructions sont sélectionnées selon leur profil de monodispersité et de stabilité en FSEC, une technique de chromatographie couplée à un système de détection de fluorescence, développé par Gouaux, qui permet d'identifier les protéines les plus prometteuses pour les essais de cristallisation (Kawate and Gouaux, 2006). Elles restent fonctionnelles mais ont des profils cinétiques modifiés. Il n'existe pour l'instant pas de structure complète.

Il est maintenant démontré que les domaines intracellulaires de P2X sont impliqués dans les phénomènes de désensibilisation et de dilatation du pore, ainsi que dans la régulation

fonctionnelle en servant de plateforme de contact avec les éléments potentiellement régulateurs du milieu intracellulaire (Hausmann et al., 2015).

Outre les expériences de substitution de segments protéiques et de mutations ponctuelles, ce sont des techniques utilisant la fluorescence qui ont permis d'investiguer le rôle de ces régions en mettant en évidence des variations d'environnement à une échelle compatible avec les mouvements ciblés. Ces techniques, sensibles, permettent une étude avec une résolution spatio-temporelle satisfaisante. Le FRET est une méthode puissante pour la détection de variations de distances au cours d'un phénomène dynamique en milieux biologiques. Elle s'appuie sur la propriété qu'on certaines molécules de pouvoir se relaxer d'un état excité vers un état fondamental par un transfert d'énergie non radiatif vers une autre molécule. La proximité spatiale du donneur et de l'accepteur est un facteur déterminant l'efficacité du FRET, tout comme l'orientation relative des deux molécules. Ce transfert d'énergie s'effectue via l'interaction des électrons de l'accepteur avec le champ électrique oscillant dipolaire produit par le donneur. Ce phénomène nécessite un recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'excitation de l'accepteur. La fourchette d'exploration de distances de cette méthode est de 1 à 10nm, elle est donc adaptée à l'étude des mouvements intermoléculaires et intramoléculaires des protéines. Dans l'exploration des différents états actifs de P2X, le FRET entre les composés CFP (donneur) et YFP (accepteur) fixés à l'extrémité C-terminale de rP2X2 a permis de mettre en évidence un mouvement du domaine intracellulaire lors du passage vers un état dilaté (Fisher et al., 2004).

3. Mode de fonctionnement allostérique

La caractérisation électrophysiologique des récepteurs P2Xs démontre que le fonctionnement de ces récepteurs est basé sur leur capacité à changer de conformation. De par leur nature multimérique, des interactions indirectes entre les différents sites de fixation du ligand peuvent avoir lieu, on parle alors de coopérativité dans un contexte global d'allostérie. Différents modèles formalisent ce mode de fonctionnement, dont les deux plus importants sont les modèles MWC et KNF que je vais brièvement exposer.

3.1. Modèles allostériques

3.1.1. Modèle MWC

Le modèle allostérique MWC fut développé par Jacques Monod, Jeffries Wyman et Jean-Pierre Changeux pour expliquer les régulations enzymatiques des protéines oligomériques (Monod et al., 1965). Il s'appuie sur le fait que la protéine existe sous au moins deux états, un en absence et un en présence du ligand, états qui sont en équilibre thermodynamique. Il suppose que la fixation d'une molécule de ligand est indépendante de la fixation d'une autre molécule du même substrat : les constantes de dissociation sont donc les mêmes pour tous les sites de fixation dans chacun des deux états. La symétrie de l'oligomère est préservée lors des transitions allostériques, impliquant un mouvement concerté des sous-unités. L'affinité intrinsèque pour le ligand dépend alors de la structure globale et non pas du nombre de ligands fixés. La présence du ligand dons son site déplace l'équilibre entre l'état ouvert et l'état fermé.

Dans un modèle à deux états allostériques (B fermé et A ouvert), l'équilibre entre les deux états est décrit par la formule $B_n=L*A_n$ où n est le nombre de molécules de ligand fixées (n=0 à i ligand), L la constante allostérique qui définit la proportion de A et de B ($L_n=B_n/A_n$) et qui varie en fonction du ligandage (Figure 2.9). L est une propriété intrinsèque de la protéine lorsque n=0.

La courbe représentant ce modèle est une hyperbole qui rend compte des phénomènes de coopérativité.

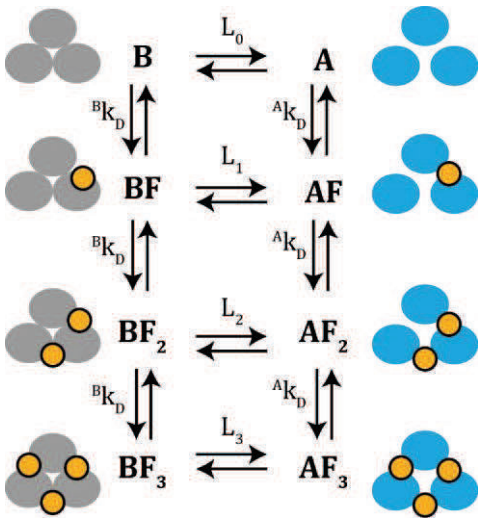


Figure 2.9 : Modèle allostérique MWC appliqué à un récepteur trimérique à trois sites de liaison. A et B sont les états actif et fermé respectivement, F est le ligand, L la constante d'équilibre et k_D la constante d'affinité.

3.1.2. Modèle KNF

Le modèle MWC implique une certaine rigidité du site de liaison du ligand, le modèle de l'ajustement induit ou KNF, développé par Daniel Koshland, Georges Nelethy et David Filmer, a lui été développé sur le postulat que la liaison séquentielle du ligand induit un changement conformationnel des sous-unités les unes après les autres (Koshland et al., 1966). L'affinité pour le ligand augmente donc en fonction du nombre de molécules fixées, phénomène se traduisant par la diminution de la constante de dissociation K_D. Il suppose également que l'ouverture du canal n'a lieu que dans un état où tous les sites de liaison sont occupés (Figure 2.10).

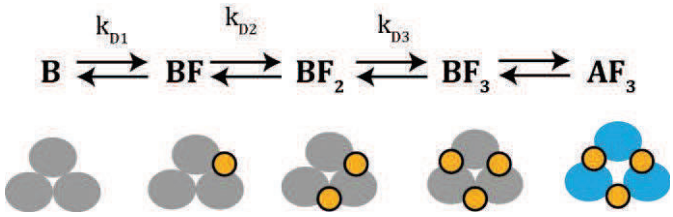


Figure 2.10 : Modèle séquentiel KNF appliqué à un récepteur trimérique à trois sites de liaison. A et B sont les états actif et fermé respectivement, F est le ligand, k_D la constante d'affinité.

3.1.3. Autres modèles

Les deux modèles précédents permettent d'expliquer le comportement de nombreuses protéines vis-à-vis de leur ligand, notamment celui des LGICs. Ainsi, le modèle MWC explique avec succès l'observation d'états spontanément actifs (Cao et al., 2009) alors que le modèle KNF explique la corrélation entre la fermeture du site de liaison et l'efficacité de l'agoniste constatée sur les récepteurs AMPA (Armstrong and Gouaux, 2000). De ce fait, des améliorations de ces modèles ont été proposées ces dernières années, compilant les deux théories, afin d'expliquer par exemple la coexistence des états sous-conductants observés lors des enregistrements électrophysiologiques en canal unique (Ding and Sachs, 1999) et d'états intermédiaires fermés (Moffatt and Hume, 2007). La théorie du « Flipped state », très documentée sur les autres récepteurs (Lape et al., 2008) stipule notamment l'existence d'un état obligatoire fermé d'énergie intermédiaire en équilibre avec les états ouverts et fermés ligandés.

3.2. Différents états allostériques des récepteurs P2Xs

Concernant les récepteurs P2Xs, au moins trois états allostériques différents existent : un état de repos fermé, un état actif de haute affinité pour l'ATP, un état désensibilisé de haute affinité pour l'ATP mais dont le canal est fermé. D'après le modèle MWC, ces états préexistent et l'ATP ne fait que stabiliser les conformations pour lesquelles il a la plus forte affinité. D'autres états ont, de plus, été identifiés ces dernières années et leur existence montre la complexité des transitions qui s'opèrent au sein de la protéine.

3.2.1. Etat intermédiaire de haute affinité

Des premiers enregistrements en canal unique réalisés sur les récepteurs P2X2, Ding et Sachs déduisent que trois molécules d'ATP doivent être liées dans leur site pour induire l'ouverture du récepteur. Ils observent également une coopérativité positive entre les sites de liaison (Ding and Sachs, 1999). Depuis, l'utilisation de concatémères s'est révélée cruciale pour la connaissance de la stœchiométrie d'activation de ces récepteurs : l'introduction d'une mutation K69A sur des concatémères rP2X2 n'induit pas de modification significative en terme de cinétique ou de conductance comparé à un wild-type, alors que la présence de deux ou trois alanines rend les constructions non-fonctionnelles (Stelmashenko et al., 2012). Ainsi, la preuve que deux molécules d'ATP suffisent pour l'activation des récepteurs P2Xs était faite. D'autres travaux récents ont explorés la sélectivité aux autres nucléotides en présence d'une très faible concentration d'ATP : une augmentation des courants a lieu lors de la co-application d'ATP 3µM et de CTP 10µM ou d'ADP 30µM, alors que ces deux derniers nucléotides n'induisent pas d'ouverture lorsqu'ils sont appliqués seuls. La même observation est faite sur des concatémères avec un seul site de liaison abolit (Browne and North, 2013). Compilés, ces résultats indiquent ainsi que l'occupation d'un seul site par une molécule d'ATP n'entraîne pas l'ouverture du canal mais qu'elle est suffisante pour induire un changement de conformation qui se répercute aux autres sites de liaison, qui perdent alors leur haute sélectivité pour l'ATP et sont ainsi plus sensibles aux autres nucléotides. De plus, le marquage partiel par la sonde SCN-ATP du résidu L186C (rP2X2), induit une potentiation des courants ATP sans ouvrir non plus le canal : il induit donc une coopérativité positive sur

les autres sites (Jiang et al., 2011). On peut émettre l'hypothèse que ce marquage piège un état partiellement ligandé existant physiologiquement, de haute affinité pour l'ATP. Enfin, l'observation à la fois d'un délai entre l'arrivée de l'ATP dans son site et l'ouverture effective du canal et d'une réponse maximale réduite de 30% lors de courtes applications (200µs) par rapport à une application longue (Moffatt and Hume, 2007) sont en faveur d'un état fermé ligandé précédant l'ouverture du récepteur. Tous ces résultats indiquent ainsi l'existence d'au moins un état intermédiaire fermé de haute affinité pour l'ATP favorisé par la présence d'au minimum une molécule d'ATP.

3.2.2. Etat dilaté

La caractérisation de l'état actif I_1 perméant aux petits cations est très documentée, le point culminant de ces études étant la résolution de la structure cristallographique en 2012. Néanmoins, depuis plusieurs années, l'existence d'un deuxième état actif qui possède un diamètre de pore plus large commence à s'imposer. L'observation d'une perméabilité à des composés de grande taille, tels que le TRIS, le NMDG, l'éthidium (Virginio et al., 1999) ou des sondes calciques comme le Fura-2 (Yan et al., 2008), après une application prolongée d'ATP sur des cellules exprimant P2X7, a soulevé de nombreuses questions et trois hypothèses ont été formulées (Samways et al., 2014) : la formation de macropores résultant d'une oligomérisation des récepteurs, le couplage des récepteurs avec un hémi-canal tel que la pannexine et l'existence d'un état dilaté. La première hypothèse a été rapidement écartée par imagerie TIRF (Khakh and Egan, 2005). L'hypothèse d'un état dilaté appelé I_2 est maintenant favorisée du fait de l'observation d'une perméabilité NMDG dans des cellules déficientes en Panx-1 (Yan et al., 2008) et de l'observation de changements conformationnels par imagerie de fluorescence et FRET lors des modifications de perméabilité signant le passage de I_1 vers I_2 (Figure 2.11). La fluorescence de ces sondes variant en fonction de leur environnement, elle indique une modification conformationnelle ou une interaction avec un autre effecteur. La sonde FlAsH, dérivée de la fluorescéine, qui devient fluorescente lorsqu'elle se fixe sur un motif CC-XX-CC, a été utilisée pour prouver que l'entrée de NMDG observée lors d'application longue d'ATP (Chaumont and Khakh, 2008) était due à un réarrangement du récepteur P2X au niveau de ses extrémités intracellulaires plutôt qu'au recrutement de canaux annexes. Néanmoins, les deux

hypothèses (état dilaté et recrutement de canaux annexes) ne sont pas mutuellement exclusives et peuvent co-exister (Pelegrín, 2011) puisque des évidences d'un rôle des pannexines ont également été accumulées (Locovei et al., 2007; Pelegrin and Surprenant, 2006). Le mécanisme privilégié semble dépendre du type cellulaire et du sous-type de récepteur mais cela reste à confirmer (Samways et al., 2014).

L'étude de cet état, encore partielle, est rendue difficile par les conditions nécessaires à son observation en terme de concentrations ioniques des solutions et de cinétique d'apparition. Le cation organique NMDG et la sonde fluorescente YO-PRO1 sont utilisés pour le mettre en évidence. Cependant il n'a pas pu être identifié lors des enregistrements électrophysiologiques en canal unique. Quatre sous-types ont la capacité de passer dans cet état de conductance I_2 suite à une application prolongée d'ATP: P2X2, P2X2/5, P2X4 et

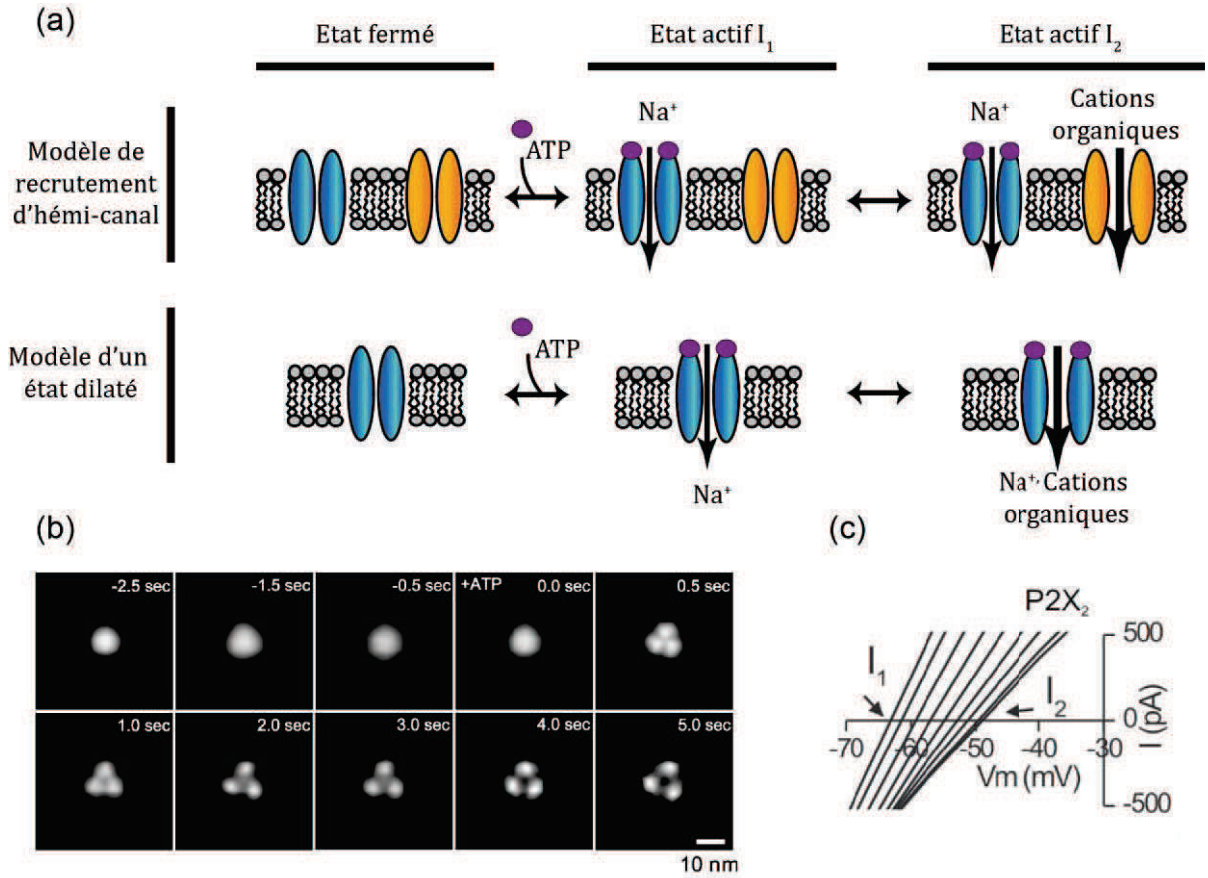


Figure 2.11 : L'état dilaté. (a) représentation schématique des deux hypothèses concernant l'état I_2 (b) changements structuraux sur P2X4 dus à l'application d'ATP observables par imagerie Fast-Scanning AFM. Avant activation, le récepteur est circulaire puis on distingue une structure trimérique après 0,5s d'application d'ATP et une dilatation du pore qui commence après 2s d'application d'ATP. (b) évolution du potentiel d'inversion en présence de NMDG lors de l'application d'ATP 100µM pendant 20s sur rP2X2, l'état I_1 présente une faible perméabilité au NMDG, celle ci augmente progressivement lors d'une application longue d'ATP (adapté de Khakh and North, 2012, Shinozaki et al., 2009, Chaumont and Khakh, 2008).

surtout P2X7. Sur un mutant P2X7 délété en domaine N-terminal, l'état I_2 est immédiat (Yan et al., 2008) alors qu'il n'a pas pu être observé sur le sous-type mP2X2 qui possède un domaine C-terminal spécifique (Eickhorst et al., 2002). Le domaine N-terminal joue a priori un rôle précoce dans la transition vers cet état, et un changement conformationnel du domaine C-terminal est également impliqué. Sur rP2X4, la mutation G347T abolit le passage vers un état I_2 (Khakh et al., 1999b). Sur rP2X2, la mutation du résidu homologue G342 en alanine favorise I_2 (Khakh and Egan, 2005). De plus, la mutation en alanine de dix résidus (F31, R34, Q37, K53, I328, I332, S340, G342, W350, L352 sur rP2X2) situés à l'interface entre TM1 et TM2 de sous-unités adjacentes affecte également les transitions I_1-I_2 (Khakh and Egan, 2004). Peu de données structurales sont donc disponibles outre le fait que le diamètre nécessaire au passage du NMDG et du YO-PRO est d'au moins 12Å (Browne et al., 2013). Le diamètre du pore des récepteurs P2Xs semblent donc avoir la possibilité de fluctuer et d'autres états intermédiaires d'ouverture pourraient donc exister.

3.2.3. Etat désensibilisé

Parmi les différents sous-types de récepteurs P2Xs, on distingue deux catégories définies selon leur cinétique de désensibilisation. D'un côté le groupe désensibilisant très rapidement composé de P2X1 et P2X3, et de l'autre ceux qui désensibilisent lentement P2X2, P2X4, P2X5 et P2X7 (North, 2002). Pour l'instant, aucune structure de cet état n'a été publiée et ce sont des études fonctionnelles qui tentent de déterminer les régions du récepteur impliquées. Etant donné que la dissociation de ^{32}P-ATP des récepteurs P2X3 est lente et que sa cinétique est similaire à celle décrivant la récupération d'une sensibilité à l'ATP, il semblerait que la libération du ligand de son site soit l'étape limitante dans le retour à un état fermé (Pratt et al., 2005). Le mécanisme moléculaire contrôlant le phénomène de désensibilisation implique apparemment les segments transmembranaires, les parties intracellulaires et un court segment de l'ectodomaine comme ont pu le montrer la construction de chimères entre P2X2 et P2X1 impliquant ces différents segments (Werner et al., 1996), ou des mutations ponctuelles dans les parties N- et C-terminales : par exemple, les mutations K373 et T374 (hP2X4) (Fountain and North, 2006), K365 et K369 (rP2X2) (Fujiwara and Kubo, 2006), L352C, L353C (Li et al., 2008) ou V21S et I22V (rP2X2) (Hausmann et al.,

2014) accélèrent la désensibilisation. Sur P2X3, la simple substitution du résidu S15 en valine est suffisante pour entraver la désensibilisation (Hausmann et al., 2014).

D'autres observations concernant l'occupation du site de liaison ont également exploré cet état. L'application de Bz-ATP, un agoniste partiel, sur P2X1 suivie d'une irradiation bloque les courants ATP, ce qui n'est pas le cas en absence d'irradiation (Agboh et al., 2009). Une hypothèse proposée est que la liaison de Bz-ATP dans le site piège le récepteur dans un état désensibilisé. Cependant, à ma connaissance aucune indication structurale n'a pu être déduite quant à la position des segments transmembranaires ou la conformation globale du récepteur. Le fait que le récepteur zfP2X4 cristallisé soit tronqué dans ses parties intracellulaires est un frein à l'élucidation structurale de cet état

3.2.4. Les états sous-conductants

Lors de l'application d'ATP, les enregistrements électrophysiologiques en canal unique montrent des « bursts » d'ouverture de durée variable entrecoupés de périodes de fermeture. La concentration d'ATP influe sur le temps de fermeture du canal et non sur le temps d'ouverture (Ding and Sachs, 1999). Au moment de l'ouverture du canal, le bruit augmente de façon importante (~30%), un phénomène qui semble intrinsèque à la protéine puisqu'il n'est pas du aux conditions expérimentales. La conductance moyenne à -100mV se situe autour de 30pS, mais vaire selon les sous-types. Des états intermédiaires de conductance plus faible peuvent également être identifiés, cependant les transitions entre les différents états sont très rapides, un phénomène appelé flickering, et étant donné que leur fréquence d'apparition est faible, la caractérisation de ses états sous-conductants est difficile (Figure 2.12).

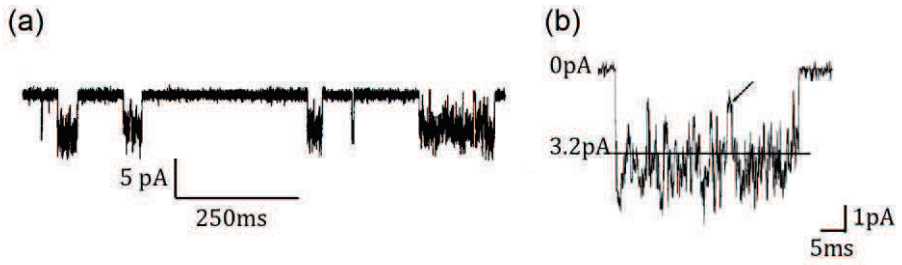


Figure 2.12 : Le phénomène de flickering. (a) Enregistrements électrophysiologiques en configuration canal unique au cours d'une application d'ATP (1,5 µM) à -100mV. (b) burst d'ouverture, la flèche représente un possible état sous-conductant, la ligne noire le courant moyen (Ding and Sachs, 1999).

3.3. Modèle allostérique appliqué aux récepteurs P2Xs

Le premier modèle cinétique a été proposé suite à la caractérisation des récepteurs P2Xs par single-channel (Ding and Sachs, 1999). Il se rapproche d'un modèle de type KNF puisque seul un état triligandé conduit aux deux états actifs connectés entre eux par un état fermé indépendant : un état partiellement ligandé ne peut, selon ce modèle, pas ouvrir le récepteur. Il stipule également que les trois sites de liaisons de l'ATP ne sont pas indépendants et qu'il y a une coopérativité entre eux. Au vu des connaissances accumulées maintenant sur ces récepteurs, ce modèle ne représente pas de façon optimale l'activation des P2Xs : si la coopérativité entre les sites de liaison de l'ATP a été démontrée, les études utilisant des concatémères (Stelmashenko et al., 2012) et des cotransfections de différents sous-types ayant un site de liaison de l'ATP abolit (Wilkinson et al., 2006) ont montré que deux molécules d'ATP liées suffisaient pour ouvrir le récepteur. De plus, l'existence d'états spontanément ouverts créés par de simples mutations ponctuelles sur TM2 (T336C, S340C et T339S sur rP2X2) (Cao et al., 2009) plaide en faveur d'un modèle MWC. En 2007, Moffat et Hume ont proposé l'ajout d'un état intermédiaire fermé précédant l'état ouvert. Intégré aux deux types de modèles (KNF et MWC), l'ajout de cet état améliore la modélisation cinétique (Figure 2.13) mais rien ne permet de discriminer entre les deux (Moffatt and Hume, 2007).

On remarque ainsi la complexité des transitions allostériques qui s'opèrent au sein de cette classe de récepteurs. Outre les états de repos, ouvert et désensibilisé, de nombreux états intermédiaires semblent exister, la protéine explorant constamment différentes conformations. Il faut donc garder à l'esprit cette notion de dynamique permanente.

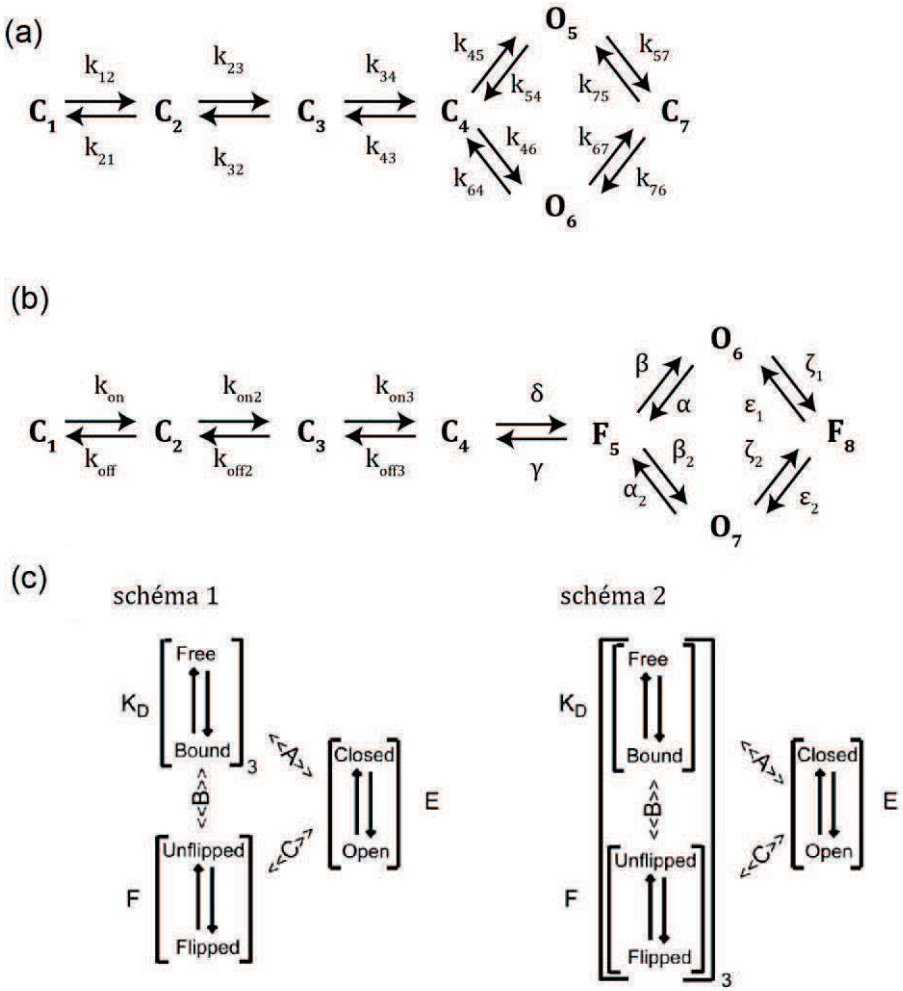


Figure 2.13 : Modèles cinétiques du fonctionnement allostérique des récepteurs P2Xs. (a) modèle KNF proposé par Ding et Sachs. (b) introduction d'un état flip dans le modèle KNF et (c) dans un modèle MWC. Le schéma 1 considère 3 couplages allostériques possibles A liaison–gating, B liaison–flipping, et C flipping–gating. Dans le schéma 2 l'état flip apparaît de manière indépendante dans chaque site de liaison (adapté de Ding and Sachs, 1999 et Moffat and Hume, 2007).

Chapitre 3 : Les dérivés d'azobenzènes, des outils puissants pour l'exploration biologique

Les deux chapitres précédents ont détaillé les différentes avancées réalisées dans la caractérisation à la fois fonctionnelle et structurale des récepteurs P2Xs depuis leur découverte. Ils ont mis en évidence le manque d'outils pharmacologiques suffisamment sélectifs d'une part, et la difficulté d'obtenir des données structurales précises dans des conditions physiologiques d'autre part. Pour palier à ces différents problèmes, l'utilisation de la lumière comme stimulus externe non invasif s'est révélée être une alternative efficace et ce dernier chapitre a pour but de montrer la diversité des approches possibles par l'utilisation d'un groupement chromophore tel que l'azobenzène.

1. Généralités sur le groupement azobenzène

L'azobenzène et ses nombreux dérivés sont connus depuis presque deux siècles en tant que colorants synthétiques. Leur propriété d'isomérisation n'a été découverte qu'en 1937 par Hartley (Hartley, 1937), et ils sont depuis utilisés dans de nombreux domaines qui vont de la chimie des polymères à l'optique non linéaire (Bandara and Burdette, 2012) pour leurs propriétés photochromiques. Leur intérêt pour l'étude des systèmes biologiques a été décelé assez tardivement mais ils sont maintenant au centre du développement de nombreuses techniques d'investigation, dans la mesure où le changement de conformation induit par la lumière peut être exploité tant pour limiter l'accessibilité de molécules que pour induire des contraintes structurales. D'autres composés ont également la capacité de s'isomériser sous l'effet d'une irradiation, mais les azobenzènes présentent l'avantage d'être stables contrairement aux stilbènes qui subissent des oxydations ou des cyclisations de la forme *cis* irréversibles, et n'interagissent pas avec les protéines comme la forme intermédiaire zwitterionique appelée mérocyanine des spiropyranes (Szymański et al., 2013).

1.1. L'isomérisation

Détaillons tout d'abord le processus d'isomérisation qui leur confère leur propriété d'intérêt. Les azobenzènes existent donc sous deux configurations *trans* et *cis* distinctes ayant chacune des propriétés spectrales différentes. L'isomère *trans* est le plus stable thermodynamiquement, sa structure est plane avec une symétrie de type C_{2h}. Il présente un spectre d'absorption à trois bandes distinctes : une bande à 228nm correspondant aux transitions π-π* des groupements phényles, une bande à ~320nm correspondant aux transitions π-π* délocalisées sur l'ensemble de la molécule et une bande à 440nm de faible intensité due aux transitions n-π* du groupe azo. L'isomère *cis* a, quand à lui, une structure non planaire de symétrie C_2 et les plans des groupements phényles forment un angle de 56°. Ceci implique un moment dipolaire non nul de 3 Debye environ. La bande d'absorption à 440nm est plus intense que celle de l'isomère *trans*, alors que les deux autres bandes d'absorption sont de plus faible intensité à 280nm et 250nm. La distance entre les carbones en position 4 et 4' varie de 9Å pour l'isomère *trans* à 5Å pour le *cis*. La transition *trans* -> *cis* s'effectue sous l'effet d'une irradiation à 320nm et a lieu à l'échelle de la picoseconde, la transition *cis* -> *trans* a lieu soit sous l'effet d'une irradiation à 450nm soit par relaxation thermique, mais la conversion totale n'est alors obtenue qu'au bout de plusieurs heures (Figure 3.1). La photoisomérisation présente l'avantage d'avoir un haut rendement quantique et un phénomène de photo-blanchiment limité. Sous irradiation, la photoconversion n'est pas totale et l'état photostationnaire est de l'ordre de 20% *trans* / 80% *cis* lors d'une irradiation à 313nm et 90% *trans* / 10% *cis* lors d'une irradiation à 436nm.

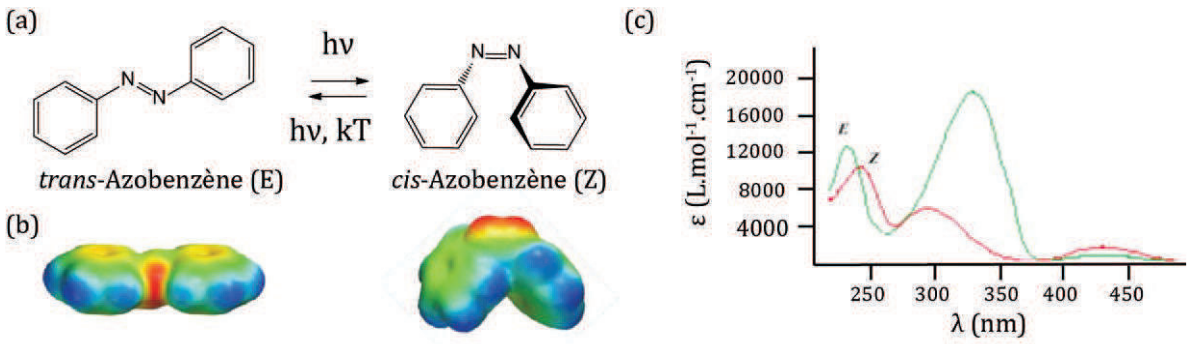


Figure 3.1: Isomérisation de l'azobenzène. (a) structures des isomères trans (E) et cis (Z) de l'azobenzène (b) modèles CPK des isomères de l'azobenzène colorés en fonction du potentiel électrostatique (du rouge négatif au bleu positif) (c) spectre d'absorption UV-Visible des isomères E et Z de l'azobenzène dans l'éthanol (adapté de Hamon et al., 2009 et Beharry et Woolley, 2011).

Par contre, à l'équilibre à l'obscurité, on retrouve presque exclusivement l'isomère *trans* (>99,99%).

L'état photostationnaire d'une solution d'azobenzène sous irradiation est du à la compétition entre les phénomènes d'isomérisation *cis -> trans*, *trans -> cis* du fait du recouvrement partiel des spectres d'absorption des deux isomères, ainsi que de la relaxation thermique. Il dépend donc des propriétés de la molécule : rendements quantiques des deux processus de photoisomérisation, constante de relaxation thermique, mais également de l'intensité du rayonnement incident, de la longueur d'onde d'irradiation, de la température et de l'environnement du chromophore. Il peut être déterminé en solution par RMN ou par spectroscopie.

Quatre mécanismes différents d'isomérisation (Bandara and Burdette, 2012) sont possibles et peuvent avoir lieu simultanément. Les deux principaux qui font consensus sont une rotation qui implique une rupture de la liaison π pour permettre la libre rotation autour de la liaison N-N, et un mécanisme d'inversion où un des angles N=N-C devient plan (180°) (Figure 3.2). Une inversion concertée où les deux angles N=N-C augmentent jusqu'à 180° et une inversion assistée par une rotation où les deux phénomènes ont lieu simultanément ont également été décrites. Par contre, la transition *cis -> trans* par relaxation thermique ne peut pas avoir lieu par le mécanisme de rotation. Il faut noter que de nombreux paramètres

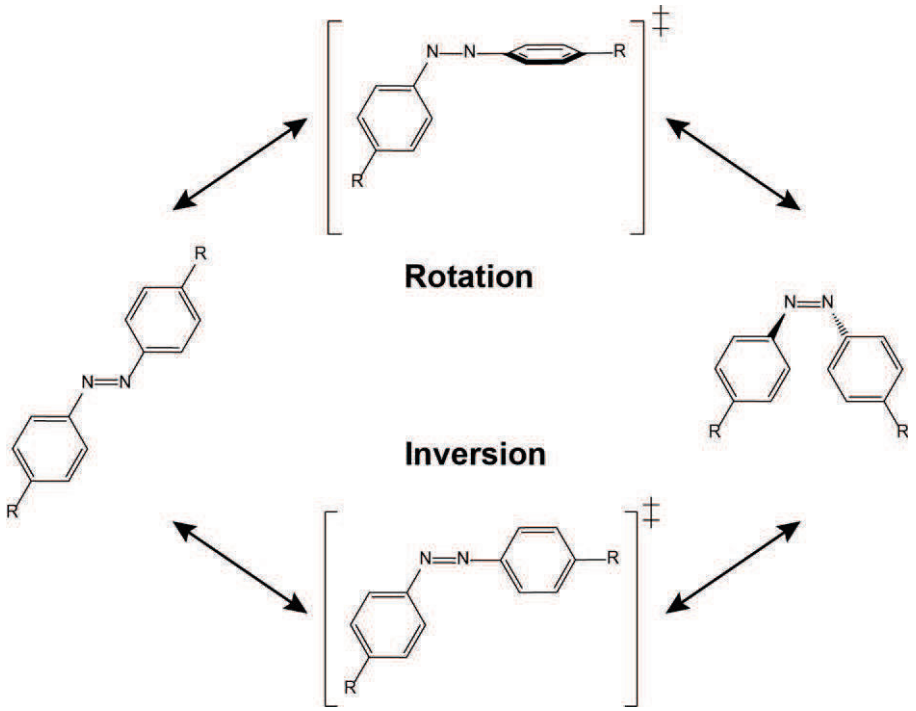


Figure 3.2: Les deux mécanismes principaux d'isomérisation de l'azobenzène (adapté de Bandara et Burdette, 2012).

(polarité et viscosité des solvants, mode d'excitation, longueur d'onde d'irradiation…) influencent le phénomène d'isomérisation et que les longueurs d'ondes données précédemment ne sont valables que pour l'azobenzène non substitué.

1.2. Effet des substitutions

En effet, le type de substituants et la position à laquelle ils sont introduits sur les cycles phényles influencent fortement les propriétés d'absorption de l'azobenzène. Historiquement, trois catégories d'azobenzènes (Bandara and Burdette, 2012) ont été définies en fonctions de l'énergie nécessaire aux transitions π-π* et n-π*: les dérivés d'azobenzènes dont les propriétés spectrales sont peu différentes de l'azobenzène non substitué, les aminoazobenzènes ayant au moins un groupement amino ou hydroxy en position 2 ou 4, et les pseudostilbènes qui regroupent les azobenzènes protonés et les push-pull azobenzènes, composés ayant un groupement électrodonneur en position 4 et un électroattracteur en position 4'. D'une manière générale, les substituants dits donneurs de densité électronique comme les groupements amino ou méthoxy, favorisent l'état excité plus dipolaire et ont donc un effet bathochrome sur le spectre d'absorption de ces dérivés. Etant donné qu'ils diminuent la barrière énergétique en augmentant la densité électronique dans l'orbitale π*, ils favorisent également la relaxation thermique (Dokić et al., 2009).

La substitution en position *ortho* peut, de plus, induire des effets stériques qui peuvent être mis à profit pour réduire la relaxation thermique tout en gardant un spectre d'absorption décalé vers les grandes longueurs d'onde. Par exemple, l'introduction d'une pipérazine en *ortho* d'un amidoazobenzène impose une légère rotation des cycles pour limiter la gêne stérique, ce qui diminue la conjugaison du système et déstabilise l'état *trans* : la relaxation thermique est alors ~600 fois plus lente que sur l'azobenzène non substitué en *ortho* (Sadovski et al., 2009).

Parmi toutes les substitutions testées, j'aimerais citer la cyclisation de l'acétamido-azobenzène par formation d'un pont C_2 en position ortho des deux cycles (Samanta et al., 2012) ; de manière remarquable, le composé *cis* est l'isomère le plus stable et la séparation de la bande d'absorption correspondant à la transition n-π* est de 85nm. Il n'y a alors pas de recouvrement des spectres dans les grandes longueurs d'ondes (Figure 3.3). De la contrainte

stérique imposée sur ce composé découle ainsi une inversion de l'isomère stable thermodynamiquement et une photoconversion en *cis* quasi complète.

De très nombreux travaux ont disséqué l'effet de multiples combinaisons de substitutions sur les propriétés spectrales, ce qui permet maintenant de concevoir des molécules adaptées à l'étude de systèmes divers et d'optimiser les longueurs d'ondes d'absorption, les équilibres photostationnaires et les temps de relaxation.

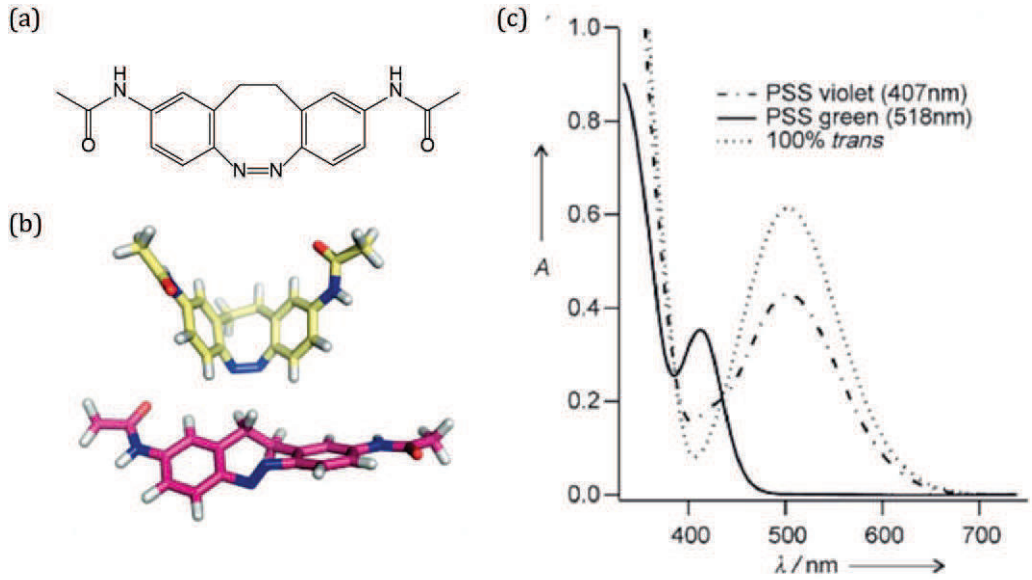


Figure 3.3 : Dérivé d'azobenzène ponté en C2. (a) structure du (Z)-N,N'-(11,12-dihydrodibenzo[c,g][1,2]diazocine-2,9-diyl)diacetamide (b) représentation 3D du composé basée sur la structure cristallographique de l'isomère cis (c) spectres d'absorption obtenus dans le DMSO des états photostationnaires (PPS) (Samanta et al., 2012).

2. Applications biologiques du photoswitch

2.1. Contraintes inhérentes à l'application biologique

Le fait que le stimulus induisant l'isomérisation de l'azobenzène soit la lumière est un avantage majeur pour l'utilisation de ces molécules : il s'agit en effet du stimulus idéal pour les systèmes biologiques dans la mesure où il est non invasif, peu ou pas délétère pour les tissus et surtout qu'il présente une haute résolution spatiale et temporelle qui permet un contrôle d'une de très haute précision. Cependant, toutes les molécules activables ou modifiées réversiblement par la lumière ne sont pas forcément utilisables dans un système biologique, elles doivent répondre à des critères précis (Beharry and Woolley, 2011). Tout d'abord, l'irradiation nécessaire doit être compatible avec les tissus biologiques, c'est-à-dire

dans une gamme de longueur d'ondes comprise entre le proche UV et l'infra-rouge (340-800nm). Décaler le spectre d'absorption vers un rayonnement de faible énergie présente plusieurs avantages : le rayonnement va pénétrer avec une meilleure efficacité les tissus car il sera moins absorbé par les autres biomolécules, et les effets délétères du rayonnement UV via la formation de radicaux libres seront moindres. De plus, le coefficient d'extinction molaire doit être élevé pour limiter la puissance du rayonnement nécessaire et le phénomène de photo-blanchiment limité afin de subir plusieurs cycles d'irradiation efficaces. Il est également préférable que l'isomère *trans* stable en l'absence d'irradiation, régule un état inactif afin d'éviter une activation permanente ou des irradiations UV longues. L'échelle de temps de la photoconversion doit être plus faible que le phénomène biologique étudié. Les dérivés azobenzènes répondent pour la plupart à ces critères. Comme pour tout composé utilisé en milieu biologique, les molécules doivent être stables dans le milieu, notamment résister à un environnement réducteur, peu dégradées et inertes avant, pendant et après l'irradiation. La notion de solubilité est également essentielle pour l'accès à la cible. Enfin, elles doivent induire un signal détectable par exemple un changement dans l'activité de la protéine étudiée.

2.2. Applications pharmacologiques

En neurobiologie plus peut-être que dans d'autres domaines, la pharmacologie traditionnelle a montré ses limites. Elle a été confrontée, entre autre, à une difficulté d'accès des cibles étudiées, à une complexité difficilement modélisable des réseaux neuronaux, et un manque de sélectivité pour les cibles. L'optopharmacologie a alors démontré son intérêt, l'outil pharmacologique photosensible permet d'activer sélectivement par la lumière des récepteurs natifs. Elle englobe différentes approches, dont la conception de ligands cagés photolabiles (Donato et al., 2012; Gautier et al., 2014; Matsuzaki et al., 2001) que je ne développerai pas ici, et celle de ligands photochromiques. Par la suite, la pharmacologie optogénétique qui consiste à ingénierer un récepteur afin de créer un point d'accroche pour un ligand photoisomérisable, a vu le jour, permettant l'étude toujours plus précise des voies de signalisation et la discrimination des types neuronaux exprimant une même cible (Figure 3.4).

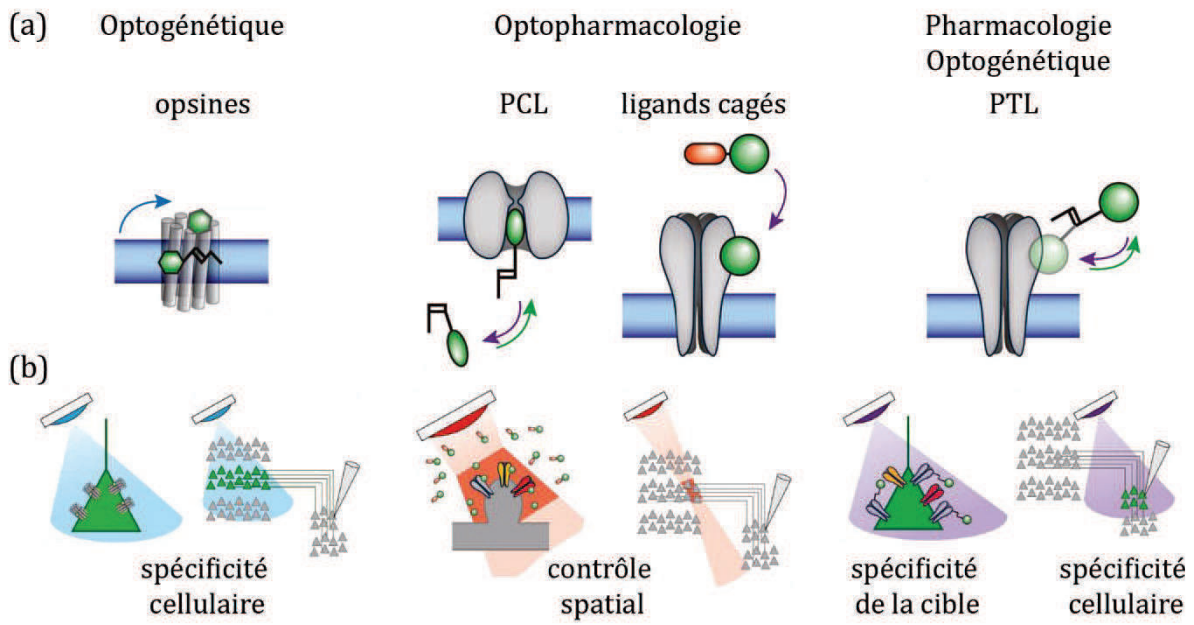


Figure 3.4 : Les outils photochimiques utilisés en pharmacologie. (a) représentation schématique du principe des méthodes utilisées (b) avantages de l'utilisation de chacune des méthodes pour l'étude du système nerveux (adapté de Kramer et al., 2013).

2.2.1. Ligands photochromiques en optopharmacologie

Les ligands photochromiques (PCLs) sont des molécules où l'azobenzène contrôle la présentation du ligand à son site, ce ligand pouvant être un agoniste, un antagoniste ou un bloquant du canal. Ils sont utilisés pour conférer une sensibilité à la lumière aux neurones en modulant l'activité des canaux ioniques ou des LGICs présents (Kramer et al., 2013), mais ne résolvent pas le problème de la sélectivité pour la cible. La preuve du concept a été réalisée sur une enzyme, la chymotrypsine, sur laquelle l'isomère *cis* d'un dérivé azobenzène couplé à un inhibiteur de l'activité enzymatique augmente le taux d'inactivation relativement à celui produit par l'isomère *trans*, et ce phénomène peut être réversé par une exposition à une lumière bleue (Kaufman et al., 1968). Les travaux pionniers dans le domaine des LGICs concernent les récepteurs nicotiniques où une différence nette d'activité entre les isomères *cis* et *trans* du 3,3'-bis[α-(trimethylammonium)methyl]azobenzene dibromide (3,3'-bisQ) a été démontrée : seul l'isomère *trans* a une activité agoniste (Bartels et al., 1971; Lester et al., 1979). Par la suite, un développement rationnel de cette approche a conduit à la synthèse de dérivés azobenzènes du glutamate (2*S*,4*R*)-4-substitués qui ont montré une activité agoniste spécifique des sous-types iGluR5 et iGluR6 activés alors préférentiellement par l'isomère

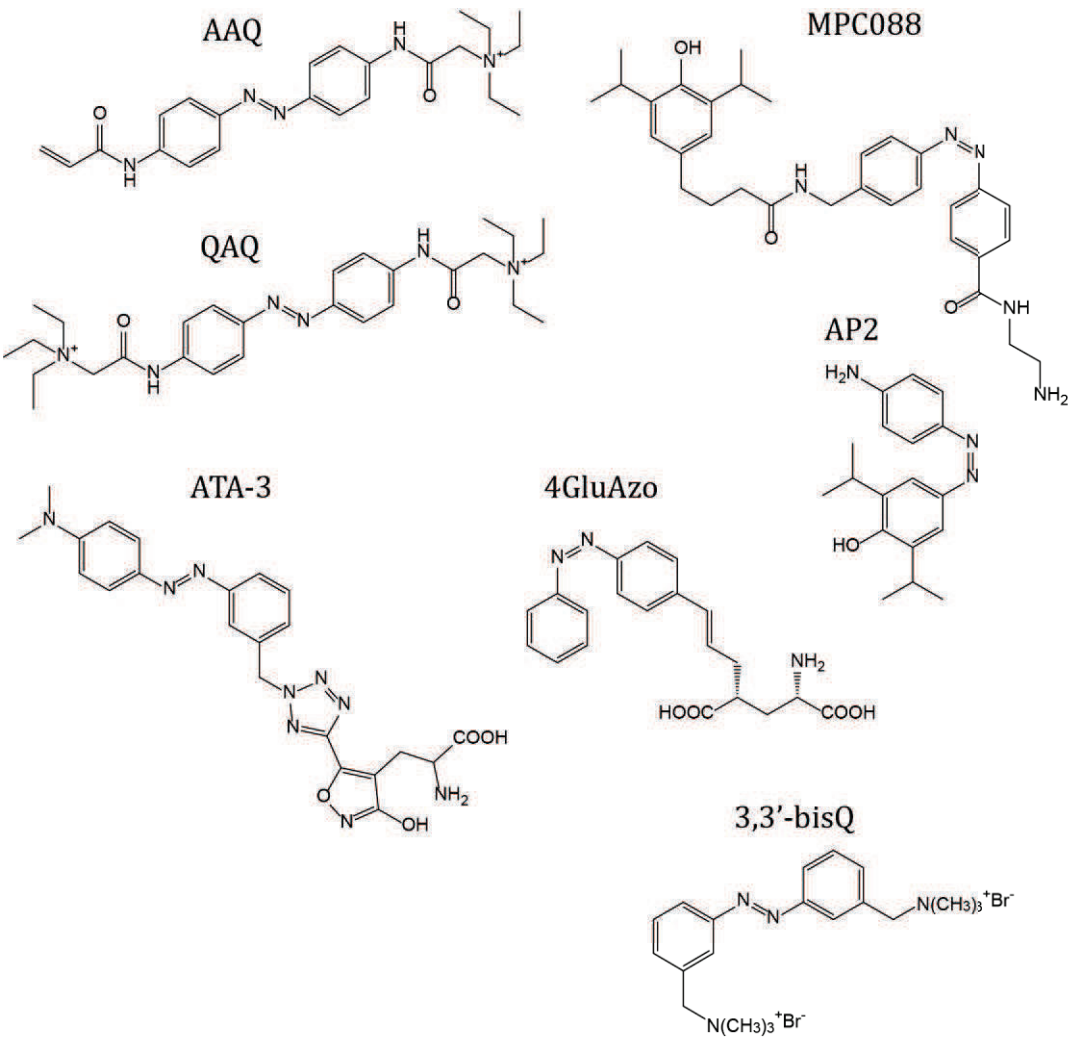


Figure 3.5 : Les principaux PCLs développés sur les LGICs et les canaux potassiques.

trans : une différence d'affinité apparente de l'ordre de 10 fois est observée entre les deux isomères du 4GluAzo (Volgraf et al., 2007) ; puis Stawski et al. ont conçu des molécules sélectives des récepteurs AMPA telles que l'ATA-3 (Stawski et al., 2012). Plus récemment, des dérivés du propofol ont été développés sur les récepteurs du $GABA_A$: les composés MPC088 (Yue et al., 2012) et AP2 (Stein et al., 2012), dont le spectre d'absorption est déplacé dans le rouge (λ_{max} 404nm), sont les premiers potentiateurs photochromiques développés montrant une activité *in vitro* et *in vivo* : les courants chlore induits par le GABA sont potentialisés par le *trans*-AP2 et non par le *cis*-AP2. Enfin, les canaux potassiques voltage-dépendant étant des cibles d'intérêt majeur dans la transmission du potentiel d'action, de gros efforts ont été fournis concernant le développement de PCLs sur cette cible. Depuis le premier composé actif bloqueur du canal, le AAQ (Fortin et al., 2008),

différents dérivés ont été synthétisés dans le but d'optimiser ce ligand et de comprendre son fonctionnement. Le AAQ est un azobenzène qui possède à une extrémité un ammonium quaternaire et à l'autre extrémité une queue acrylamide lui permettant un ancrage à la membrane au niveau du vestibule interne du canal. Il accède au milieu intracellulaire et agit en tant que trans bloqueur. (Banghart et al., 2009) De nombreuses combinaisons de substitutions ont été testées (Banghart et al., 2009; Mourot et al., 2011, 2012), certaines permettant d'obtenir des cis bloqueur (suite aux modifications de la queue acrylamide), d'autres entraînant un déplacement du spectre d'absorption (par ajout d'une queue amine électro-donneuse). Afin de palier au manque de sélectivité pour la cible, les auteurs se sont servis de la propriété du QAQ, composé doublement chargé, de passer la membrane via des récepteurs TRPV1. La coapplication de capsaïcine, agoniste de ce récepteur, et de QAQ permet de cibler spécifiquement des neurones sensitifs de la douleur chez le rongeur (Mourot et al., 2012) (Figure 3.6).

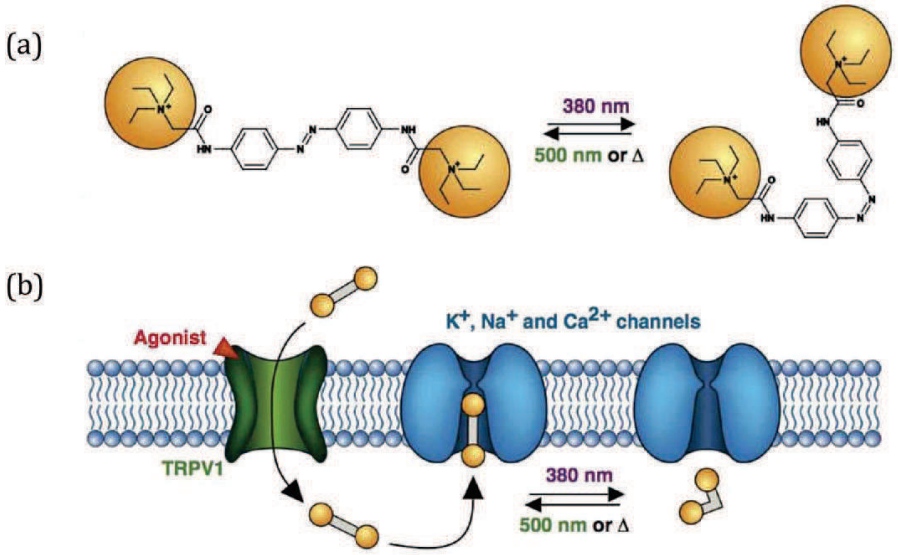


Figure 3.6 : Principe d'utilisation du QAQ comme PCL. (a) structures des isomères trans et cis du QAQ (b) le QAQ étant imperméable, il atteint la partie intracellulaire de sa cible par le baiais des canaux TRPV1 puis régule l'activité des canaux potassiques, sodiques et calciques (Mourot et al., 2013).

Ainsi, cette approche utilisant les PCLs est intéressante dans la mesure où elle permet une modulation ciblée de l'activité d'un récepteur grâce à la résolution spatiale et temporelle apportée par la lumière. Cependant, elle nécessite des efforts de synthèse chimique pour l'optimisation de ces ligands qui doivent présenter une différence significative d'activité entre les deux isomères. Si elle ne résout pas tous les problèmes de la pharmacologie

classique, on peut envisager le développement de stratégies astucieuses impliquant des propriétés propres à un type de neurones particulier pour palier au manque de sélectivité et permettre l'étude de voies spécifiques d'un type cellulaire.

.

2.2.2. Ligands photoswitchables en optogénétique : stratégie PTL

2.2.2.1. Principe et molécules disponibles

Les avancées techniques réalisées dans le domaine de la génétique ont permis depuis une quinzaine d'années, d'envisager des approches originales en neurobiologie afin d'étudier toujours plus précisément le rôle des différents canaux et récepteurs impliqués dans les circuits neuronaux et *in fine* dans les différents processus comportementaux et cognitifs. L'approche la plus développée jusqu'à maintenant est celle des channel-rhodopsines (Boyden et al., 2005; Hegemann and Möglich, 2011) que je n'aborderai pas en détail ici. Elle consiste à exprimer une opsine microbienne de type I, qui est un canal ionique sensible à la lumière, dans une population de neurones et d'étudier les effets de la stimulation de ces neurones en aval du système. Néanmoins, si elle permet d'activer sélectivement un type de neurone, elle pêche quant à l'étude de la cible biologique en elle-même. Une autre approche, qui découle de l'utilisation des PCLs a également vu le jour : la stratégie utilisant les PTL (photoswitchable tethered ligand). Cette stratégie originale consiste à attacher covalamment à une protéine ingénierée un ligand synthétique sensible à la lumière. Elle allie spécificité de la génétique et précision spatiale et temporelle due à l'irradiation (Kramer et al., 2013). Le postulat à la base de cette technique est que l'isomérisation de la molécule va permettre de présenter le ligand à son site de fixation ou de l'en éloigner. Elle nécessite de créer un point d'ancrage cystéine proche du site de fixation.

Le premier PTL développé par ingénierie moléculaire est le MAQ (Figure 3.7), actif sur les canaux potassiques modifiés SPARK de la drosophile (Banghart et al., 2004). Précédemment étudié, les azobenzènes avec une charge positive sont des bloqueurs de ce type de canaux (Blaustein et al., 2000). Un point d'ancrage proche du pore dans la partie extracellulaire a permis la fixation covalente du MAQ. Le composé *trans* entraîne un blocage stérique du canal, alors que le composé en *cis* éloigne la charge du pore, permettant l'activité de ces canaux. Ces premiers résultats ont par la suite été exploités et étendus aux

canaux potassiques Kv de mammifères (Fortin et al., 2011; Sandoz et al., 2012). Parallèlement aux PCLs, un PTL des récepteurs glutamatergiques a été développé (Volgraf et al., 2006), le MAG (maléimide-azobenzène-glutamate). Fixé sur le LBD des récepteurs kaïnates iGluR6, il permet la présentation du glutamate à son site par l'isomère *cis*. Le complexe formé par la protéine et le ligand est alors nommé LiGluR (light-gated ionotropic

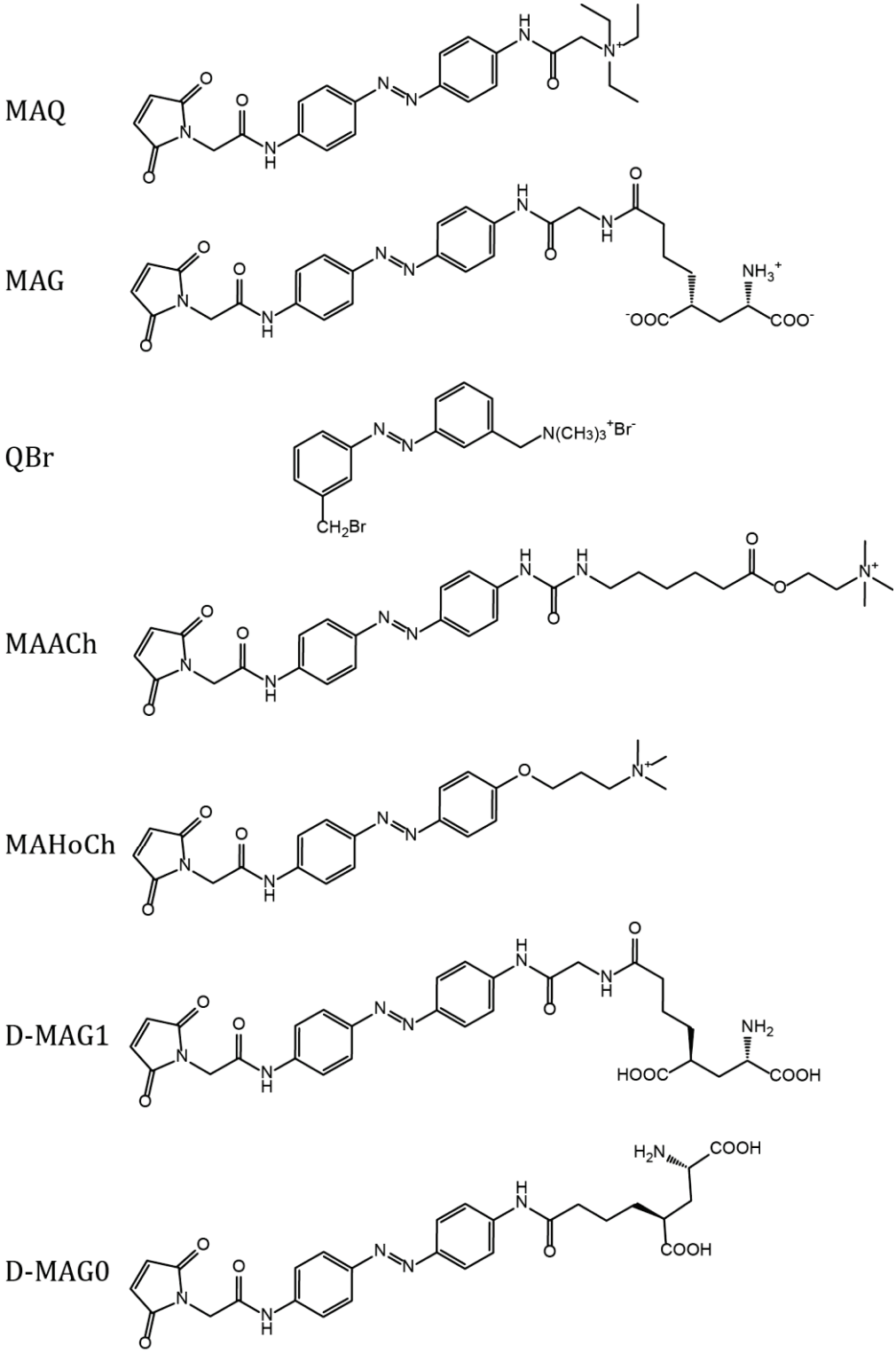


Figure 3.7 : Les principaux PTLs développés sur les LGICs et les canaux potassiques.

glutamate receptor) (Figure 3.8). Sachant que le mécanisme d'activation des récepteurs glutamatergiques passe par une fermeture du site de liaison autour du ligand, on pourrait donc penser que le bras espaceur permettant la présentation du glutamate empêcherait au moins en partie ce mécanisme et serait donc un frein à cette approche. Or, la résolution de la structure cristallographique de iGluR6 ayant montré la présence d'une voie d'accès appelée « canal de sortie » (Mayer, 2005b), les auteurs ont supposé que la gêne stérique due à la présence du bras serait minime, ce qui est bien le cas. Le succès de cette approche a ouvert la voie à l'exploration d'autres récepteurs comme les récepteurs pentamériques. Des travaux pionniers en 1980, avaient déjà permis d'obtenir un récepteur nicotinique photorégulé, en exploitant la présence d'un pont disulfure endogène dans le site de liaison des nAChRs (Lester et al., 1980). Réduit, une des cystéines pouvait alors réagir avec un groupement bromoéthyle porté par le composé dérivé d'azobenzène Q-Br : il s'agissait du premier PTL appliqué à un récepteur canal. Depuis, un PTL agoniste MAACh et un antagoniste MAHoCh ont été synthétisés et fixés sur la sous-unité β à proximité de la poche de fixation de l'acétylcholine (Tochitsky et al., 2012). Ce sont, comme pour les iGluRs, les isomères *cis* qui sont actifs. Enfin, des PTLs des récepteurs du $GABA_A$ sont en développement (Kramer et al., 2013; Yue et al., 2012). Récemment, cette stratégie a été étendue aux récepteurs métabotropiques du glutamate avec une molécule agoniste D-MAG0 et une antagoniste D-MAG1 (Levitz et al., 2013) (Figure 3.7).

Cette stratégie peut permettre pour la première fois, de discriminer le rôle d'une même cible exprimée dans des cellules différentes voire de distinguer l'activation pré- et postsynaptique, ou de cibler spécifiquement des sous-types des différents récepteurs. Elle permet donc l'étude de l'implication d'une cible endogène dans les voies neurobiologiques avec une précision inégalée.

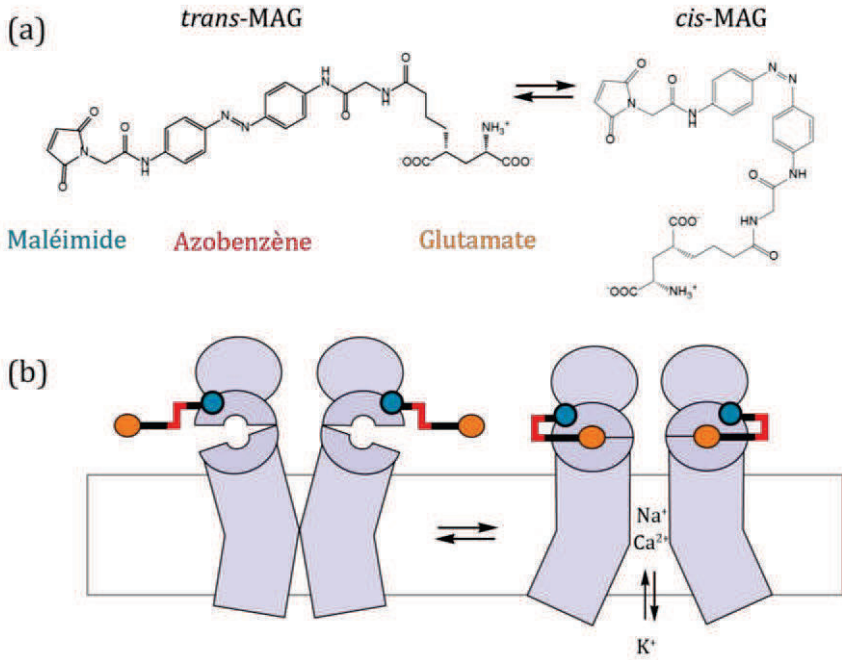


Figure 3.8 : Stratégie PTL appliquée à un récepteur glutamatergique. (a) structures des isomères de l'agoniste photorégulable MAG. (b) représentaion schématique du principe de la photorégulation du récepteur iGlu par le MAG (adapté de Volgraf et al., 2007).

2.2.2.2. Challenges à relever

Si, en théorie, cette stratégie semble simple, elle nécessite des travaux en amont d'optimisation. Tout d'abord, sa réussite est conditionnée par la bonne présentation du ligand dans son site. Il est donc nécessaire d'identifier les parties du ligand nécessaire à l'activité et impliquées dans des interactions avec les résidus du site actif et celles orientées vers le solvant dont la modification a peu d'influence sur l'affinité du ligand. De plus, la taille du bras espaceur est déterminante : il doit être suffisamment long pour éviter les « clashs » stériques, notamment lors du mouvement de fermeture du site autour du ligand, et flexible pour permettre une certaine adaptation du ligand présenté afin qu'il adopte la bonne orientation. Cependant, trop de flexibilité nuit également puisque malgré l'isomérisation, le ligand peut alors explorer un large domaine de distances et potentiellement entrer dans le site même dans l'isomère voulu inactif. Les problèmes de synthèse rencontrés pour coupler les différentes parties du PTL ne sont pas souvent abordés, mais ils sont coûteux et nécessitent l'exploration de nombreuses stratégies, du fait, notamment, de l'hydrolyse du groupement maléimide en conditions basiques. Concernant l'ingénierie de la protéine étudiée, un criblage des positions potentielles du site d'ancrage est nécessaire pour

identifier celle qui permet une réponse optimale. Il est guidé par les structures cristallographiques et les logiciels de docking.

Une fois ces étapes franchies et les tests *in vitro* préliminaires réalisés, d'autres challenges sont à relever pour espérer une application *in vivo* (Kramer et al., 2013). Tout d'abord, l'expression de la cible mutée dans des proportions proches de celles physiologiques est nécessaire. On peut alors, si la cible est multimérique, faire en sorte que l'homomère de sous-unités mutées ne s'exprime pas et que l'expression à la membrane soit conditionnée par l'assemblage avec une sous-unité naturelle, mais ceci nécessite d'autres manipulations génétiques en sus de la mutation du point d'ancrage. On peut également envisager l'utilisation d'organismes knock-in pour éviter les problèmes de coexpression de récepteurs non mutés et mutés. Dans le même domaine, cette stratégie est destinée à différencier un même récepteur dans des neurones ou cellules différentes, il faut alors réussir à exprimer la cible dans un type de cellule particulier, ceci est maintenant possible grâce à des promoteurs spécifiques ou par le système recombinant Cre-Lox. Un autre problème qui peut être rencontré est la difficulté d'accessibilité des cibles : on peut utiliser des canules pour le système nerveux, des injections intraoculaires pour la rétine, mais se sont des procédures relativement lourdes. De plus, le problème de l'efficacité de marquage en conditions biologiques se pose : le maléimide ne doit pas réagir avec d'autres composés nucléophiles présents dans le milieu, notamment toutes les cystéines, ce qui est une limite importante de cette méthode. Elle nécessite des contrôles contraignant dans lesquels la molécule est appliquée dans un système biologique identique qui n'exprime pas la cible ingénierée. De plus, le marquage nécessite que la cystéine introduite soit accessible donc dans un environnement globalement réducteur qu'on ne contrôle pas *in vivo* (Mourot et al., 2013). Des problèmes de solubilité des composés peuvent être limitant, notamment s'ils se fixent dans les membranes. Tous ces facteurs limitent fortement l'accès à la cible. Enfin, le problème de l'irradiation des tissus se pose. Le développement de fibres optiques couplées à des lasers est en plein essor pour essayer de miniaturiser ces systèmes.

2.2.3. Applications *in vitro* et *in vivo* remarquables

Attardons nous sur quelques applications de ces deux techniques afin de mesurer le potentiel qu'elles possèdent dans l'exploration des voies neurobiologiques.

La stratégie PTL a été appliquée *in vivo* avec succès sur des larves de poissons zèbres (Wyart et al., 2009). Des lignées doublements transgéniques ont été créées où GAL4 est exprimé dans des types cellulaires donnés et l'expression du récepteur photosensible LiGluR sous le contrôle de UAS dont le facteur de transcription est GAL4. Ainsi l'expression du récepteur activable par la lumière est contrôlée et n'a lieu que dans des types cellulaires connus et ciblés. Après marquage par le MAG1, le ligand PTL délivré dans l'eau du milieu dans lequel évoluent les poissons, des pulses de lumière induisent des oscillations spontanées de la queue ressemblant au comportement de nage spontanée observée sur des poissons plus âgés. Dans la lignée testée Gal4^{s1020t}, 80% des cellules qui expriment Gal4 donc LiGluR sont des motoneurones et 20% des neurones du sous type Kolmer Agduhr (KA). La même expérience réalisée sur la lignée Gal4^{s1003t} qui exprime Gal4 uniquement dans des neurones KA montre des mouvements similaires de la queue, alors les individus de la lignée Gal4^{s1041t} dont seuls les motoneurones expriment Gal4 ne répondent pas aux impulsions lumineuses. Les neurones KA étant GABAergiques, les auteurs on testé l'effet d'un antagoniste du GABA sur la lignée Gal4^{s1020t} et ils observent une forte diminution des oscillations en réponse aux stimuli lumineux. Ils en concluent que la stimulation des neurones KA est suffisante pour induire le comportement précoce de nage spontanée et qu'il s'agit d'un processus dépendant du GABA. Cette étude montre la capacité de la stratégie PTL à identifier le degré d'implication de différentes populations de neurones dans une voie de signalisation in vivo.

Le système oculaire est une cible d'intérêt dans le développement de ces stratégies dans un contexte thérapeutique de par le fait qu'il est constamment stimulé par la lumière et que l'on peut alors s'affranchir des contraintes d'accessibilité. Les stratégies d'optogénétiques ont été envisagées comme des potentiels outils thérapeutiques, cependant ce sont des thérapies géniques qui, outre les problèmes techniques, soulèvent de nombreuses questions, notamment éthiques, et dont la sécurité reste à prouver. Dans ce contexte, la stratégie PCL est plus abordable puisqu'elle ne nécessite pas de manipulations génétiques et quelle est réversible. La perte des cellules photoréceptrices (cônes et bâtonnets) entraine une perte de la vision progressive tout en laissant les neurones intacts, cependant un remodelage important du réseau a été identifié (Marc et al., 2014). Sur un modèle murin rd1/rd1 de dégénération rétinienne, l'injection intravitreuse de AAQ entraîne une diminution drastique de l'activité des cellules du RGC (retinal ganglion cell) sous une irradiation à 380nm, réversible par une irradiation à 500nm (Polosukhina et al., 2012). Ce

résultat va à l'encontre de ce qui avait été observé sur des neurones en culture, puisque le *trans*-AAQ est un bloqueur des canaux potassiques. Il s'avère en fait, qu'une très forte proportion de cellules amacrines est présente, ces cellules étant inhibitrices normalement. La fixation du AAQ sur celles-ci explique le profil d'excitation observée lors du passage en *cis* du composé. L'utilisation du AAQ semblait alors compromise par son absence de sélectivité vis-à-vis des cellules (aucune discrimination), et sa faible photosensibilité. L'équipe a alors testé des composés dont le spectre d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'ondes, la vitesse de relaxation thermique rapide, la photosensibilité plus importante et une demi-vie en milieu physiologique plus longue (2 jours), le DENAQ. Il s'avère que ce composé cible également les canaux HCN surexprimés apparemment en cas de dégénérescence rétinienne (en tout cas chez les souris modèle), ce qui augmente son efficacité (Marc et al., 2014; Mourot et al., 2013). Cette molécule pourrait être un candidat à l'application clinique de cette stratégie dans les années à venir.

Enfin, une application très récente des PTL m'a paru intéressante dans la mesure où l'utilisation pharmacologique première de cette technique est détournée pour en faire un outil d'exploration du gating des récepteurs kaïnates dans une approche d'investigation structurale (Reiner and Isacoff, 2014). Le but de l'étude était d'établir une relation entre l'occupation du site de liaison par le ligand et les phénomènes d'activation et de désensibilisation. Les auteurs ont coexprimés des sous-unités GluK2 présentant une mutation L439C, qui peuvent donc être marquées par le PTL et des sous-unités GluK5 naturelles, la stœchiométrie d'assemblage étant connue (2:2). Les ligands utilisés sont le MAG, agoniste de forte efficacité, fixé à GluK2, la 5-iodowillardine (5-IW), agoniste sélectif de GluK5, et la concavalline A (ConA) qui supprime le phénomène de désensibilisation. Ils peuvent ainsi activer sélectivement les deux types de sous-unités, séparément ou de manière simultanée et observer les profils d'activation et de désensibilisation (Figure 3.9). La liaison de ligand dans deux sites active le récepteur mais n'entraîne pas de désensibilisation, alors que 4 sites occupés entraînent une forte désensibilisation. Ils observent également que la liaison d'un ligand n'est pas suffisante pour activer le récepteur, et que 3 induisent une désensibilisation partielle. Ils proposent pour finir un assemblage des LBD en hérédimères où chaque dimère forme une entité distincte et où la liaison d'un seul agoniste n'est pas suffisante pour modifier l'interface entre les dimères et induire le phénomène de

désensibilisation. Ainsi, on accède à des informations sur les mécanismes impliqués dans les transitions allostériques très précises.

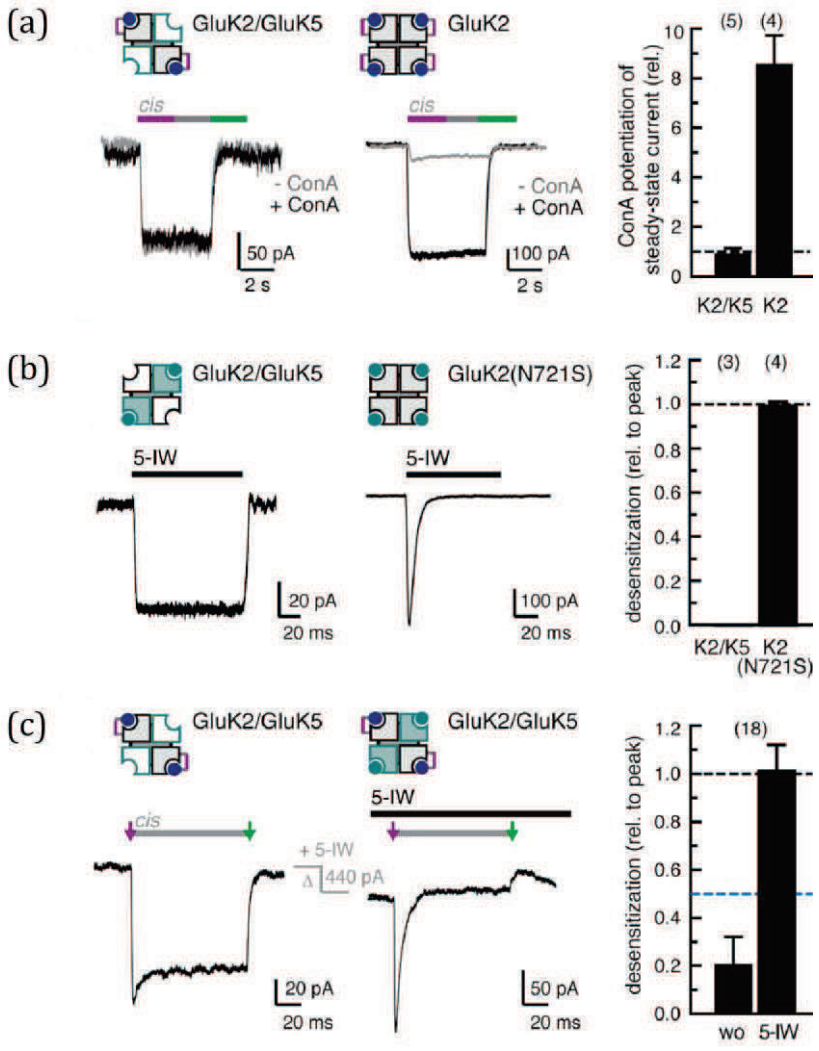


Figure 3.9 : Utilisation du MAG pour l'étude de la désensibilisation des récepteurs iGluR . (a) l'activation spécifique par le MAG des sous unités GluK2 au sein des hétéromères GluK2/GluK5 induit des courants qui ne sont pas potentialisés par l'ajout de concavalline, alors que sur les homomères GluK2, les courants initiaux induits par l'irradiation sont plus faibles et sont potentialisés par l'ajout de concavalline. (b) l'application de 5-iodowillardine sur les hétéromères GluK2/GluK5 induit des courants qui ne désensibilisent pas. Sur l'homomère GluK2 portant la mutation N271S qui permet à l'iodowillardine d'être un agoniste de ce sous-type, l'applicationn de 5-IW induit des courants qui désensibilisent très rapidement. (c) Sur les hétérotétramères GluK2/GluK5 marqués par le MAG, l'irradiation UV induit des courants qui désensibilisent peu. L'addition de 5-IW lors de l'irradiation conduit à une désensibilisation complète des récepteurs (Reiner et Isacoff, 2014).

2.3. Applications structurales : crosslinkers photoisomérisables

2.3.1. Généralités sur le photocontrôle structural

Outre les applications de modulations fonctionnelles des protéines, les azobenzènes peuvent également être utilisés dans une optique d'exploration structurale. En effet, les protéines sont des macromolécules qui possèdent une organisation régie par la présence de motifs secondaires précis tels que les hélices α (structure périodique compacte) et les feuillets β (structure périodique étendue) qui découlent de la formation de liaisons hydrogènes entre les acides aminés. Il est alors rationnel d'imaginer qu'une modification induite par la présence d'un groupement photoisomérisable peut stabiliser ou déstabiliser l'organisation de la chaîne peptidique et que ce changement localisé, s'il a lieu dans une région charnière, peut se répercuter sur l'ensemble de la protéine. L'énergie photochimique est ainsi transformée en mouvement physique.

Trois stratégies ont été envisagées pour obtenir un photocontrôle de la structure peptidique : une incorporation du « photoswitch » dans la chaîne latérale d'acides aminés, une incorporation directement dans le squelette de la chaîne polypeptidique ou un pontage entre des chaînes latérales (Beharry and Woolley, 2011).

La première approche se base sur une modification de l'environnement électrostatique des résidus proches du groupement introduit et sur une modification de l'encombrement stérique plutôt que sur une contrainte structurale imposée. Elle a été appliquée avec succès sur des polypeptides. Des premiers travaux réalisés par Goodman montrent une modification structurale de polymères de phenylazophenylalanine et d'acide γ-benzyl-glutamique, mise en évidence par une modification de l'effet Cotton, suite à une irradiation (Benedetti and Goodman, 1968). Par la suite, d'autres polypeptides ont été étudiés : l'organisation de polymères de dérivés azo de l'acide glutamique dans l'eau à pH acide est modifiée sous l'effet d'une irradiation, avec une structure moins ordonnée après irradiation UV. A pH 7,6 dans un mélange eau-surfactant, le composé *trans*, apolaire, forme des interactions avec les micelles alors que le composé *cis*, plus polaire déstabilise ces interactions et favorise la formation d'hélices α (Pieroni et al., 2001) (Figure 3.10). Ces observations montrent que la photoisomérisation peut avoir une influence majeure sur la structure des peptides et quelle est dépendante de l'environnement. Cependant, dans cette approche, il est nécessaire d'incorporer de nombreux groupements azobenzènes pour

obtenir un effet structural, ce qui est un inconvénient majeur pour une utilisation sur des protéines. Elle est donc plus adaptée à d'autres domaines d'étude comme les biomatériaux par exemple (Szymański et al., 2013).

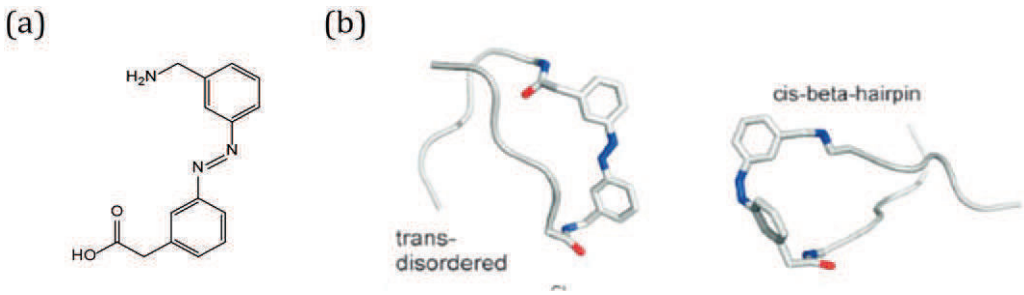


Figure 3.10 : Exemple d'un photoswitch incorporé dans le squelette du polypeptide. (a) Structure du dérivé azobenzène acide 3-(3-aminomethylphenylazo)-phenylacetique (AMPP) (b) formation du coude induite par l'isomère cis de l'AMPP introduit dans une séquence peptidique (adapté de Benharry et Woolley., 2011).

L'incorporation du motif azobenzène dans le squelette carboné de la chaîne polypeptidique est plus prometteuse dans la mesure où elle doit pouvoir induire un changement drastique d'orientation des acides aminés situés de part et d'autre du groupement photochromique. Cette approche peut ainsi être envisagée comme outil de contrôle du repliement polypeptidique. De nombreux travaux montrent que cette technique peut mimer la formation d'un coude β et induire la formation de conformations telles que les motifs β hairpin sur des modèles de polypeptides. Les études successives concernant les changements de conformations suite à des irradiations sur des peptides cycliques incorporant un azobenzène (dérivés APB et AMPB), ont prouvé que l'isomérisation pouvait créer un coude β dans ces peptides (Renner et al., 2000; Schütt et al., 2003). Vollmer a quant a lui montré que l'incorporation d'un azobenzène entre 2 cycles octapeptidiques permettait de contrôler l'organisation macroscopique des molécules : dans sa conformation *trans*, le composé forme des liaisons intermoléculaires alors que le composé *cis* a une organisation intramoléculaire qui traduit un changement des liaisons hydrogènes (Vollmer et al., 1999). Par la suite, d'autres équipes se sont intéressées à des peptides linéaires, le remplacement d'un motif dipeptidique (^{D}Pro-Gly ou ^{L}Asn-Gly) responsable de la conformation en motif β-hairpin a permis de contrôler l'oligomérisation : si l'isomère *trans* forme des aggrégats, l'isomère *cis* quant à lui forme des monomères qui présentent une organisation β-hairpin (Aemissegger et al., 2005). La technique a également fait ses preuves sur des protéines *via*

l'incorporation de PAP (phenylazophenlylalanine) : l'activité enzymatique d'analogues de RNase S (James et al., 2001), peroxidase (Muranaka et al., 2002) ou BamH1 endonucléase (Nakayama et al., 2004) par exemple, peut être augmentée ou diminuée selon l'isomérisation ; lorsqu'elle est introduite sur l'activateur de transcription bactérien CAP (catabolite activator protein), on observe une diminution de l'affinité (~4 fois) pour le cAMP induite par l'isomère *cis* (Bose et al., 2006). Cependant, la réversibilité de ces effets sur la fonction de ces différentes cibles n'est pas optimale (Beharry and Woolley, 2011). Cette approche montre néanmoins qu'il est possible d'induire des changements conformationnels au sein d'une protéine par l'introduction d'un seul groupement azobenzène et ainsi d'altérer spécifiquement la fonction de la protéine ciblée.

Enfin, le pontage entre les chaînes latérales est une approche utilisant des crosslinkers photoisomérisables qui présente l'avantage de permettre un contrôle plus fin des changements structuraux induits et d'éviter d'importantes modifications génétiques du squelette carboné. Elle nécessite la conception de molécules originales qui, outre la partie isomérisable azobenzène, possèdent deux points d'ancrage au système étudié, classiquement des groupements réactifs vis-à-vis des thiols tels que les maléimides (dégradés à pH basique) ou les α-chloro- et iodoacétamides beaucoup moins réactifs cependant. L'isomérisation du composé va contraindre le système et induire un changement structural contrôlé et réversible. Dans cette approche, le contrôle de la distance entre les deux extrémités de la molécule est primordial, il est donc nécessaire de conserver une certaine rigidité en limitant le nombre de isomères dus à la rotation autour des liaisons simples. Etant donné qu'une partie de mes travaux de thèse s'appuie sur cette approche, je vais maintenant détailler les différentes applications de cette technique.

2.3.2. Crosslinkers photoisomérisables

2.3.2.1. Applications aux peptides

Les travaux pionniers dans ce domaine ont été réalisés par l'équipe de Woolley. Ils ont conçu un composé diiodoacétamide azobenzène (Kumita et al., 2000) capable de ponter deux résidus cystéines introduits sur une chaîne peptidique, espacés de 6 résidus (i,i+7) appelé JKR7 ou de 10 (i,i+11) FK11 (Figure 3.11). L'isomère *cis* stabilise la formation de l'hélice α sur le peptide JKR7, l'isomère *trans* celle d'hélices sur le peptide FK11.

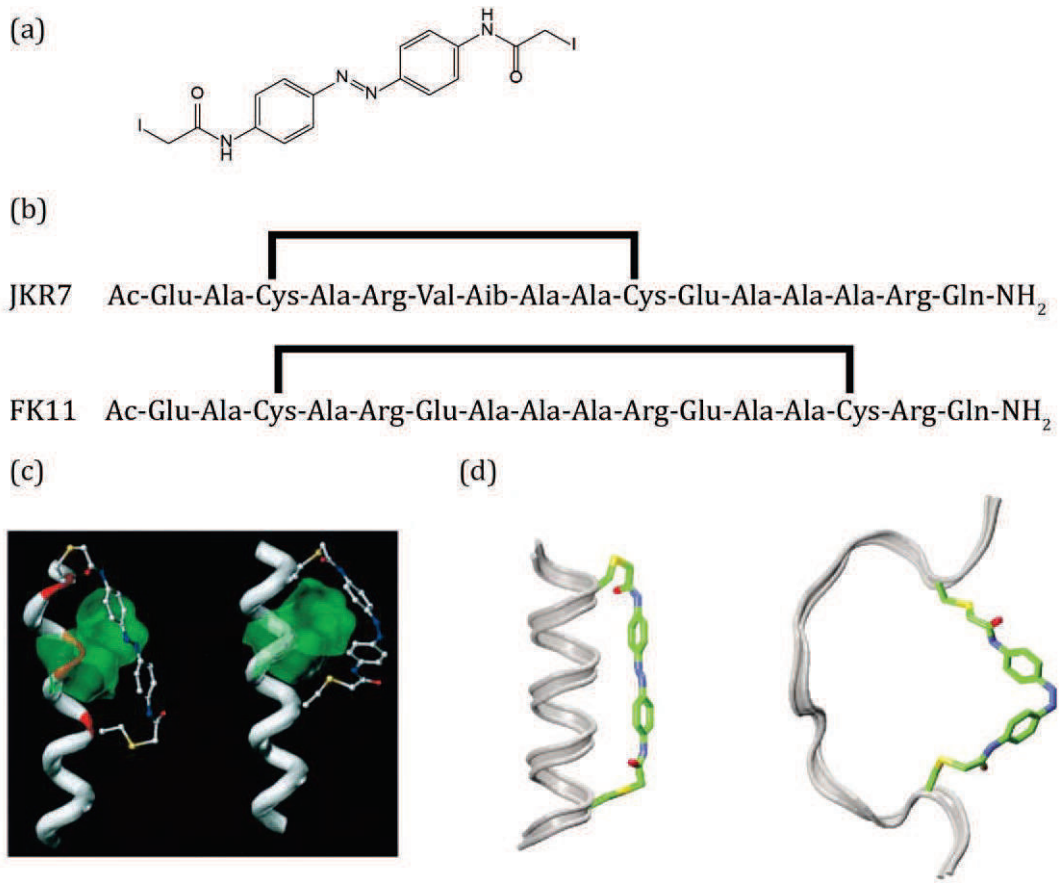


Figure 3.11 : Exemple d'un crosslinker photoswitchable sur une chaîne polypeptidique. (a) structure du crosslinker diiodoacetamide azobenzene (b) séquences peptidiques des peptides modèles JKR7 et FK11, Aib acide aminobutyrique, les crosslinkers pontent les deux cystéines entre elles (c) modèle du crosslinking obtenu sur le peptide JKR7, l'isomère cis favorise l'hélice α (d) modèle du crosslinking obtenu sur le peptide FK11, l'isomère trans favorise l'hélice α (adapté de Flint et al., 2002, Kumita et al., 2000).

L'isomérisation du composé sur le peptide JKR7 en composé *trans* entraîne une diminution de la proportion d'hélices α de 48 à 12%. L'inverse est observé sur le peptide FK11 (Flint et al., 2002; Kumita et al., 2000). Ces travaux ont prouvé la faisabilité de l'approche utilisant des crosslinkers photoisomérisables pour contrôler la formation et la stabilisation des hélices α. Par la suite, la même équipe à développé des composés plus solubles (BSBCA), avec des groupements sulfonates en position *méta* qui présentent le même profil que les composés précédemment décrits, l'isomère *trans* stabilise l'hélice sur FK11, l'isomère *cis* sur JKR7 (Zhang et al., 2003). Un développement rationnel de ces composés a conduit à la synthèse de séries MTS permettant d'obtenir des temps de relaxation thermique (*cis->trans*) plus ou moins longs selon les substitutions (de 43h à 11s) (Chi et al., 2006; Pozhidaeva et al., 2004), ou de composés bis-azobenzènes dont la variation de distances entre les deux extrémités est

augmentée (de 5 à 23Å selon les composés) (Samanta and Woolley, 2011). L'isomère *trans* du BPDB et du BPDBS pontent des peptides i,i=19 et i,i+21 alors que l'isomère *cis* ponte un peptide i,i+11. Récemment, un azobenzène ponté entre les deux cycles phényles (Samanta et al., 2012) a montré des propriétés intéressantes : l'isomère *trans* marque le peptide FK11 mais l'équilibre thermodynamique étant en faveur de l'isomère *cis*, c'est la forme non hélicoïdale qui est favorisée. De plus le profil d'absorption est inversé et l'isomère *cis* est complètement stable en conditions réductrices physiologiques alors que le *trans* a une demi-vie de 2,3h. Il peut ainsi être utilisé comme un commutateur on-off, l'irradiation UV permettant de structurer par intermittence la structure en hélices α.

Cette stratégie a également été appliquée pour contrôler des assemblages intermoléculaires et non plus seulement au sein d'une même chaîne polypeptidique. La formation de triples hélices entre des peptides modèles du collagène a pu être photorégulée par le marquage avec un dérivé d'azobenzène rigidifié avec un linker de type acétylène (Kusebauch et al., 2006, 2007). Les points d'ancrage n'étaient plus des résidus cystéines car elles affectaient elles-mêmes la stabilité de la triple hélice, ce sont donc des mercaptopyrrolidines qui ont été introduites. Si l'isomère *trans* permet la formation des triples hélices, l'isomère *cis* induit par une irradiation UV la déstabilise, phénomène réversible par une irradiation à 420nm qui restaure l'assemblage.

Suite à ces résultats plus qu'encourageants, il restait encore à prouver que ces changements structuraux étaient suffisants pour induire une modification de la fonction des peptides et qu'ils pouvaient être corrélés à des processus biologiques. C'est chose faite avec une étude concernant le peptide HDH-3 conçu pour lier la séquence d'ADN cible QRE (TAATCC). Le pontage des deux cystéines introduites i,i+11 n'induit pas de modification d'affinité et de spécificité de reconnaissance lorsque le composé est en conformation *trans*, mais la photoisomérisation en *cis* réduit fortement la liaison à l'ADN, phénomène corrélé à une déstabilisation de l'hélice α (Guerrero et al., 2005a). D'autres travaux sur des peptides liant l'ADN comme MyoD marqué par BSBCA aboutissent à la même observation : l'isomère qui déstabilise la formation d'hélice diminue l'efficacité de la reconnaissance de la séquence cible (Guerrero et al., 2005b). On arrive ainsi à corréler le changement structural du à l'irradiation à une variation du phénomène biologique dans lequel est impliqué le peptide, ce qui ouvre des perspectives pour une application *in vivo* et surtout, à l'utilisation sur des macromolécules telles que les protéines.

Tous les travaux précédemment décrits concernent des peptides dans lesquels le composé azobenzène induit une structuration ou une déstructuration intramoléculaire, or en vue d'une application aux protéines qui peuvent être multimériques, il faut également prouver que cette approche peut concerner des changements structuraux à l'interface des sous-unités donc intermoléculaires. Sachant que les peptides contenant la séquence de la région basique (BR) du facteur de transcription GCN4, peuvent s'assembler en dimère pour se lier à l'ADN, un dérivé azobenzène introduit judicieusement sur une chaîne latérale et qui ponte deux peptides pourrait favoriser ou défavoriser l'assemblage. Cette hypothèse a été testée par Caamano : après couplage des deux peptides, l'isomérisation en *cis* favorise l'interaction entre les deux chaînes qui s'assemblent et lient l'ADN, de plus le retour vers un isomère *trans* thermodynamiquement favorable est fortement inhibé en présence d'ADN (Caamano et al., 1997; Woolley et al., 2006).

2.3.2.2. Applications aux macromolécules

Suite aux travaux sur les peptides précédemment décrits, les premières applications de cette approche à des systèmes complexes ont été développées. Deux cystéines endogènes sur le fragment S1 de la myosine, dans un site pivot pour la rotation du bras levier du domaine moteur de la myosine, ont été pontées par le dérivé ABDM et malgré le faible changement conformationnel induit par l'isomérisation *cis-trans* sur le site de liaison de l'ATP, les auteurs ont pu observer une répercussion sur la rotation du bras qui tourne alors dans le sens inverse de celui produit par l'hydrolyse de l'ATP (Umeki et al., 2004). D'autres travaux ont montré que le pontage de résidus dans le domaine SH3 de la tyrosine kinase Fyn permettait d'induire par une irradiation un mouvement global de la protéine et non pas une distorsion localisée (Zhang et al., 2009). Des résultats similaires sur l'enzyme de restriction PvuII dimérique ont été obtenus puisque l'isomérisation du 4',4 bis(maleimido) azobenzene fixé sur chacun des deux segments de feuillet β proches du site catalytique induit un changement significatif (16 fois) d'activité enzymatique sans changement de l'affinité (Schierling et al., 2010).

Enfin, une application dans des cellules HEK293 a été réalisée, permettant d'étendre le champ d'application de cette approche. L'étude concerne l'interaction, au sein du facteur de transcription AP-1, de Fos et Jun appartenant à la famille des bZIP (basic leucin zipper). Le

crosslinker BSBCA est introduit sur le peptide inhibiteur dominant AFosW et ponte des cystéines espacées de 6 résidus (i,i+7) : AFosW inhibe la formation du dimère Fos/Jun actif (Figure 3.12). L'irradiation UV qui favorise la forme *cis* augmente la proportion d'hélices α *in vitro*, ce qui reflète une dimérisation AFosW/Jun plutôt que Fos/Jun : l'isomérisation induit *in fine* une inhibition la liaison de AP-1 à l'ADN (Zhang et al., 2010). Pour suivre la liaison de AP-1 et surtout quantifier l'activité dans les cellules, les auteurs ont eu recours à un reporteur de la luciférase couplé à AP-1 : ils observent suite à des pulses d'irradiation UV une inhibition de l'activité AP-1.

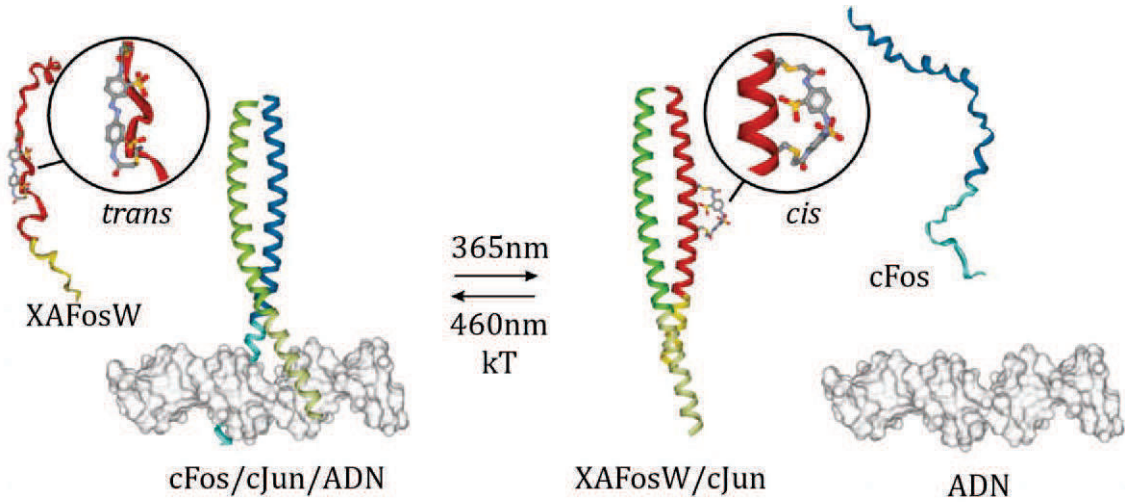


Figure 3.12 : Photorégulation de l'activité du facteur de transcription AP1. Le photocrosslinker BSBCA est introduit sur le peptide inhibiteur AFosW, l'isomère trans déstabilise l'hélice α. Lors d'une irradiation UV, le peptide crosslinké XFosW peut intéragir avec cJun au détriment du complex CFos/cJun et diminue donc la liaison de AP-1 à l'ADN. (Zhang et al., 2010)

OBJECTIFS DE LA THESE

Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, les récepteurs P2Xs représentent de nouvelles cibles pharmacologiques potentielles d'intérêt majeur qu'il reste à explorer. Néanmoins, leur rôle précis dans certaines voies physiopathologiques demeure encore mal compris, en raison d'un manque d'outils pharmacologiques spécifiques permettant de les activer sélectivement dans leur environnement natif. Outre cet aspect physiologique, l'étude de leur mécanisme d'activation à une échelle moléculaire est également essentielle pour permettre le développement de nouveaux ligands. Cependant, malgré la résolution récente de structures cristallographiques de l'état fermé et d'un état actif avec l'ATP lié dans son site, qui ont permis une avancée fondamentale, de nombreuses questions restent posées quant aux mécanismes impliqués dans les transitions vers les différents états allostériques du récepteur.

Dans ce contexte, le développement de nouveaux outils optochimiques nous a paru être une alternative judicieuse, à la fois pour l'exploration mécanistique et pour l'activation contrôlée d'un sous-type particulier, puisqu'ils permettent une maîtrise spatiale et temporelle inégalée par rapport aux outils pharmacologiques traditionnels disponibles.
Deux voies d'investigation utilisant la lumière comme outil d'étude se sont donc détachées. D'une part, la conception d'un outil optochimique innovant dérivé d'une stratégie de pharmacologie optogénétique, pour contrôler l'activité d'un récepteur ingénieré afin de palier au manque de sélectivité des autres outils. D'autre part, le développement d'un outil d'exploration des transitions allostériques capable d'induire des mouvements relatifs entre des résidus au sein de la protéine et ainsi d'étudier à un niveau moléculaire les mécanismes mis en jeu lors de l'activation du récepteur.
Les deux stratégies ont été développées avec succès sur le sous-type P2X2 de rat mais sont potentiellement applicables aux autres sous-types de récepteurs P2Xs, voire à d'autres récepteurs membranaires et constituent ainsi des outils d'étude puissants.

RESULTATS

1. Développement d'un outil optochimique pour photoréguler l'activité des récepteurs P2Xs : la stratégie d'optogating

1.1. Contexte

La première stratégie développée au cours de ma thèse, conjointement avec le doctorant Damien Lemoine, s'est inspirée des travaux concernant les canaux potassiques photosensibilisés par un PTL chargé positivement, le MAQ (maléimide azobenzène éthylammonium) (Banghart et al., 2004) (se référer à la figure 3.7 pour la structure). L'objectif premier était de concevoir un outil qui permette de bloquer réversiblement le passage des ions à travers le canal. Cette approche permettrait de s'affranchir des contraintes de sélectivité des différentes molécules utilisées jusqu'alors comme PTLs, chacune étant spécifique d'un type de récepteur de part la présence de l'agoniste fixé, et de ce fait, de limiter les problèmes d'optimisation de synthèse chimique.

1.2. Stratégie

Nous avons donc décidé de nous focaliser non plus sur le site de liaison du ligand comme c'est le cas dans les stratégies PTL, mais plutôt sur la région transmembranaire pour réguler l'activité du récepteur. Deux études ont guidé la conception de notre outil : tout d'abord, les résultats concernant le MAQ dont l'isomérisation bloque (isomère *trans*) ou non (isomère *cis*) le canal potassique (Banghart et al., 2004) ; et sur les récepteurs P2X, le fait qu'une modification chimique de certains résidus de la partie extracellulaire du pore par des dérivés MTS chargés positivement inhibe les courants induits par l'ATP et surtout, induise par elles mêmes des courants entrants non négligeables (5-25% d'un courant ATP maximal), phénomène marquant un état ouvert du récepteur (Rassendren et al., 1997). Nous avons donc choisi d'utiliser une molécule proche du MAQ, nommée MEA-TMA (maléimide éthylène azobenzène triméthylammonium), constituée de trois parties essentielles : un groupement maléimide thiol-réactif qui permet l'ancrage à la protéine, fixé à un squelette

central azobenzène permettant de contrôler l'orientation de l'extrémité chargée positivement (structure détaillée en figure 4.3). Cet outil nécessite l'ingénierie du récepteur afin d'introduire la cystéine nécessaire au marquage. Nous souhaitons ainsi contrôler par une simple irradiation l'ouverture du pore ionique et donc l'activité du récepteur (Figure 4.1).

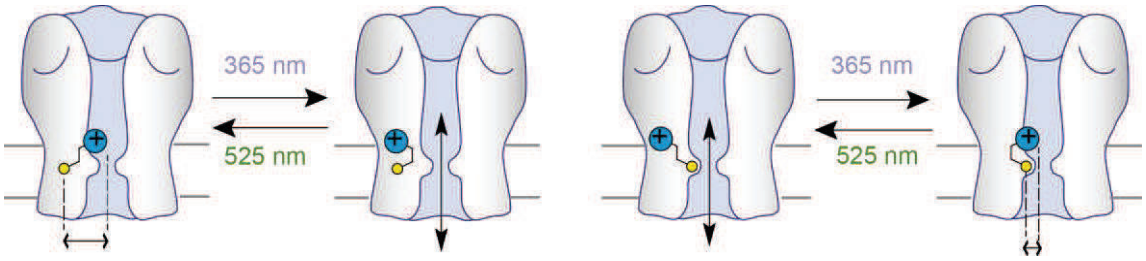


Figure 4.1 : Stratégie de photorégulation du récepteur P2X. Deux possibilités de blocage de la voie de perméation des ions sont envisagées.

1.3. Matériel et Méthodes

Mutagénèse dirigée

Le gène du récepteur sauvage rP2X2 est inséré dans un plasmide de clonage, le vecteur d'expression eucaryotique pcDNA3.1 (+) qui contient un gène de résistance à l'ampicilline. La mutagénèse est réalisée avec le kit KAPA HiFi HotStart PCR kit (Cliniscience). Les oligonucléotides sont conçus de façon à introduire une mutation ponctuelle dans la séquence et un site de restriction enzymatique qui ne modifie pas la séquence protéique afin de faciliter le criblage des colonies positives. Après la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), le mélange est digéré par l'enzyme DpnI pendant 60 minutes à 37°C, dialysé sur filtre Millipore à 0,025µM, et transformé dans des bactéries compétentes (E.Coli souche DH5α) par électroporation à 2,5V. Les bactéries sont incubées sur boîte de Pétri de LB-Agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) à 37°C, pendant une nuit. Des colonies sont sélectionnées et mises en culture en milieu liquide stérile. Le plasmide est purifié à l'aide du kit Nucleobond®XtraMaxi (Macherey-Nagel) et une fraction est digérée par l'enzyme de restriction choisie lors de la conception de l'oligonucléotide afin d'identifier les clones potentiellement positifs. La concentration plasmidique est déterminée par spectroscopie UV selon la formule [ADN]=0,05*facteur de dilution*A_{260nm} et le plasmide obtenu vérifié par séquençage (GATC Biotech).

Culture cellulaire et transfection

Les cellules HEK-293 sont cultivées dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) suppléé avec 10% de sérum de veau fœtal (Invitrogen), 1X GlutaMax, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont lavées au tampon PBS (tampon phosphate salin) avant d'être traitées à la trypsine-EDTA (Invitrogen). Elles sont semées 1 heure avant la transfection sur des lamelles de verre prétraitées à la poly-L-Lysine (Sigma) déposées dans des plaques 6 puits et incubées à 37°C en présence de 5% de CO_2. La technique de transfection utilisée est la précipitation au phosphate de calcium avec 0,05-1µg de plasmide des différentes constructions rP2X2 et 0,3 µg de plasmide GFP. Le milieu de culture (DMEM supplémenté) est remplacé par du milieu frais le lendemain et les cellules sont utilisées 24 à 48 heures après transfection.

Modélisation moléculaire

Les modèles par homologie du récepteur P2X2 de rat ont été générés en utilisant les structures cristallographiques du récepteur P2X4 de *Danio rerio* obtenues en absence (code PDB : ADW0) et en présence d'ATP (code PDB : ADW1) comme modèles, avec le logiciel Modeller.

Marquage par les dérivés azobenzène

Tous les composés ont été dilués dans l'eau pour faire des solutions stock de 1-2mM puis sont ensuite dilués juste avant l'incubation dans la solution extracellulaire NES à 200µM. Pour le MEA-OMe, une solution à 80µM dans le NES avec 1% de DMSO est réalisée extemporanément. L'incubation est réalisée pendant 5 minutes dans l'obscurité à température ambiante puis la lamelle est lavée avec du NES.

Electrophysiologie

Les courants sont enregistrés par la technique du patch-clamp en configuration cellule entière sur les cellules fluorescentes. Les micropipettes (3-5 MΩ) contiennent une solution interne ajustée à pH 7,3 par du NaOH et contenant : KCl 140 mM de, $MgCl_2$ 5 mM, EGTA 5 mM, tampon HEPES 10 mM. Le potentiel de membrane est imposé à -60mV par l'amplificateur EPC-10 (HEKA) et les enregistrements réalisés par le logiciel PATCHMASTER (HEKA). La solution externe, appelée NES (NaCl 140mM, KCl 2,8mM, $CaCl_2$ 2mM, $MgCl_2$ 2mM, glucose 10mM et tampon HEPES 10mM à pH7,3), additionnée ou non d'ATP (sel de sodium, Sigma), est délivrée par l'intermédiaire de 3 tubes parallèles de perfusion placés au-dessus de la cellule. Le système SF77A Perfusion Fast step (Warner) permet de contrôler

l'application des solutions avec un délai, lors des changements, de 5 à 10 ms. Le pH est ajusté par l'ajout de NaOH pour les fortes concentrations d'ATP (>300 µM). Le système d'irradiation est composé des LEDs Primatix (UHP-Mic-LED-525 et Mic-LED-365) couplées au microscope et contrôlées par l'amplificateur EPC-10 (HEKA), les puissances d'irradiation en sortie d'objectif sont respectivement 0,36 à 4,5mW/mm² et 2,4mMW/mm².

L'analyse des données est réalisée avec le logiciel FitMaster (HEKA Electroniks, v2x69). La courbe concentration-réponse est réalisée pour chaque construction et l'équation de Hill est déterminée à l'aide du logiciel Igor Pro (WaveMetrics, v6.32A) en accord avec l'équation

$$\frac{I}{Imax} = \frac{1}{1 + (\frac{EC50}{[ATP]})^{nH}}$$

avec I, le pic de courant induit par une concentration donnée de molécule, Imax, le courant maximum, EC50, la concentration en agoniste nécessaire pour obtenir 50% de l'effet maximum, et nH, l'indice de Hill. Les valeurs des données expérimentales sont des moyennes accompagnées du SEM (erreur standard à la moyenne). Les constantes de temps sont déduites de l'équation de décroissance exponentielle $I_t = I_0 + A \exp(-t/\tau)$ où I_0 est le courant résiduel, A l'amplitude maximale, t le temps en seconde et τ la constante de temps.

Mesure des perméabilités

Pour les mesures de perméabilités, un pont agar contenant 3M de KCl est ajouté entre l'électrode de référence et le milieu dans lequel baignent les cellules. La solution intrapipette contient 147mM KCl, 10mM EGTA, 10mM HEPES pH ajusté à 7,3 par NaOH ou 140mM CsCl, 5mM MgCl2, 5mM EGTA, 10mM HEPES pH ajusté à 7,3 par CsOH. La solution standard dont le pH est ajusté par l'ajout de NaOH contient 147mM KCl, 0,3mM CaCl2, 13mM glucose, 10mM HEPES. Les rampes ont une durée de 200ms et explorent une gamme de voltage allant de -120 à +120mV. Les concentrations des solutions de mannitol, iséthionate, calcium et NMDG sont listées dans la table 4.1.

Solution	NaCl	$CaCl_2$	Iséthionate	Mannitol	NMDG	HEPES	Glucose	solution utilisée pour ajuster le pH
Mannitol	40	0,3	-	200	-	10	13	NaOH
Iséthionate	10	0,3	137	-	-	10	13	NaOH
Calcium	-	110	-	-	-	10	13	CaOH
NMDG	-	0,3	-	-	149	10	13	HCl

Table 4.1 : Composition des solutions utilisées pour les mesures de perméabilité. Les valeurs indiquées sont en mM.

Les potentiels d'inversion sont calculés en soustrayant les courants des rampes obtenus à 525nm de ceux obtenus à 365nm. Les perméabilités sont calculées après avoir déduit du potentiel de membrane le potentiel de jonction.

1.4. Résultats

La molécule, synthétisée dans notre laboratoire par le Dr Alexandre Specht, est un amidoazobenzène non symétrique qui s'isomérise en solution sous une irradiation à 365nm d'une conformation *trans* à une conformation *cis*. Le retour à l'isomère thermodynamiquement stable *trans* s'effectue lentement par relaxation thermique (τ =16,3 min) ou rapidement lors d'une irradiation dans le domaine du visible (525nm). Il faut cependant garder à l'esprit que ces propriétés biophysiques peuvent être modifiées lors du marquage au sein de la protéine du fait du changement d'environnement.

Concernant l'ingénierie du récepteur, nous avons choisi de travailler sur le sous-type P2X2 de rat dont les courants désensibilisent lentement et sont robustes. Etant donné que notre marquage utilise la réactivité des cystéines, il a fallu muter dans un premier temps les trois cystéines endogènes accessibles (C9, C348, C430) pour créer un récepteur appelé rP2X2-3T dont les propriétés fonctionnelles sont semblables à celles du récepteur sauvage (Li et al., 2008).

Après un premier criblage de 19 résidus localisés dans la partie supérieure du canal, à la fois sur TM1 (F44C-K53C) et sur TM2 (I328C-T336C), mutés en cystéine et marqués par notre molécule, 8 mutants ont pu être photorégulés, c'est à dire que leur activité a pu être contrôlée par différentes irradiations en l'absence de tout agoniste. Deux profils électrophysiologiques se sont détachés : certains mutants marqués étaient ouverts par une irradiation UV (365nm) d'autres par une irradiation dans le domaine du visible (525nm), définissant ainsi des *cis*-openers (V48C, P329C, N333C) et des *trans*-openers (Y47C, Q52C, I328C, I332C et T336C). Localisés sur un modèle de rP2X2, les résidus avec un profil *trans*-openers sont situés à l'interface inter sous-unité alors que les *cis*-openers sont entre TM1 et TM2 au sein d'une même sous-unité (Figure 4.2). Ces résultats suggèrent que notre molécule n'agit pas simplement comme un bloqueur du canal par simple répulsion électrostatique, mais entraîne des changements conformationnels au sein de la protéine.

Nous nous sommes, par la suite, focalisés sur le mutant I328C qui présentait les courants les

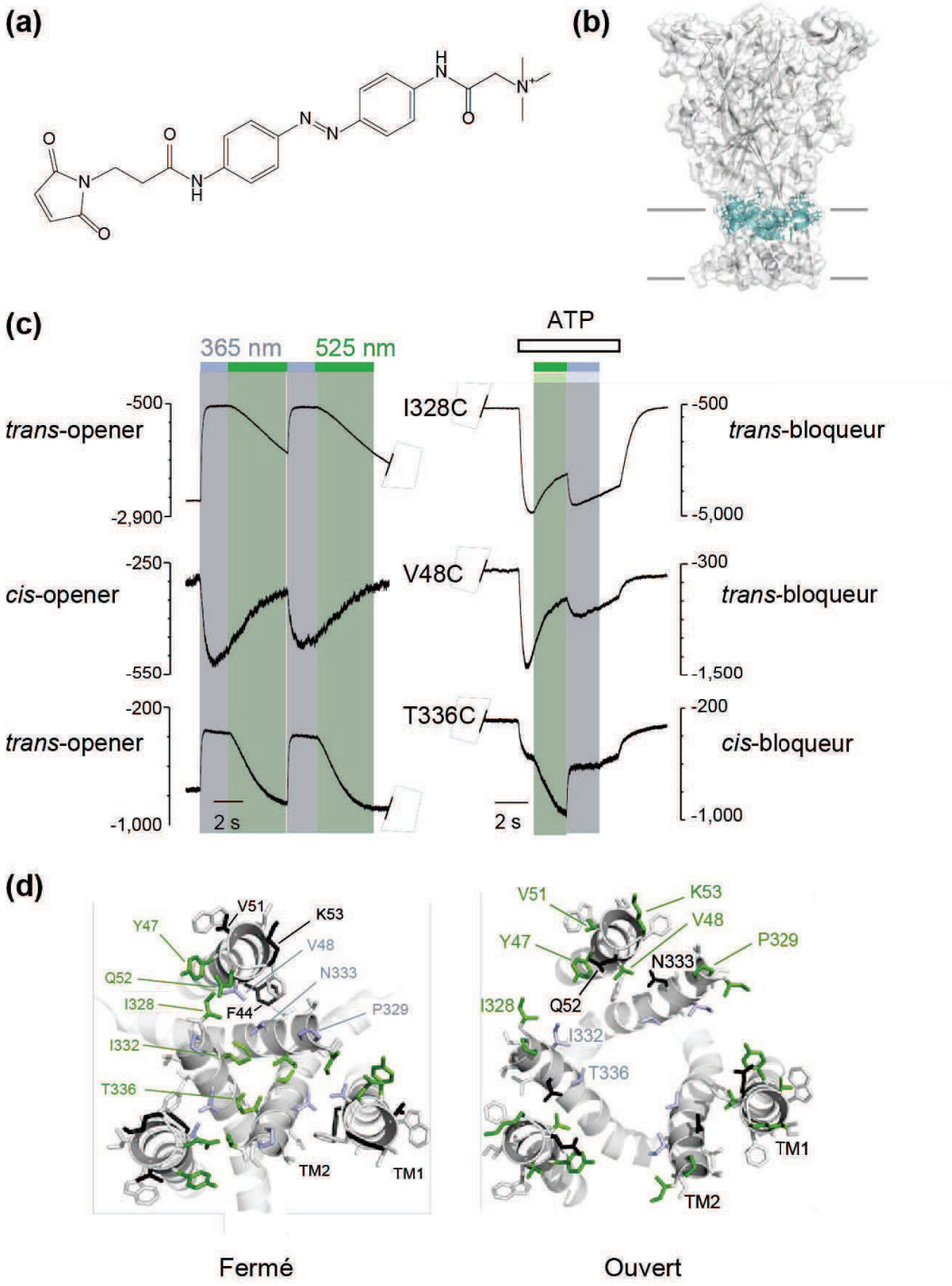


Figure 4.2 : Optogating et optoblocking. (a) structure chimique du MEA-TMA (b) localisation des résidus criblés sur un modèle par homologie rP2X2. (c) différents profils électrophysiologiques enregistrés lors des irradiations à 365 et 525nm en présence (droite) ou en absence (gauche) d'une concentration d'ATP proche de l'EC_{50}.Echelle de courant en pA. (d) cartographie des résidus *cis*-openers (gauche, violets) *trans*-openers (gauche, verts) *cis*-bloquers (droite, violets) et *trans*-bloquers (droite, verts) sur un modèle par homologie rP2X2, vue du milieu extracellulaire.

plus robustes et les plus stables et nous sommes attelés à étudier les caractéristiques du canal photorégulé. La cinétique de photo-activation (τ =0,36s ± 0,02) est plus lente que celle observée suite à une application d'ATP : le courant maximum est observé environ 1s après le début de l'irradiation alors qu'il suffit de 80ms en présence d'ATP (Trujillo et al., 2006). Si la perméabilité ionique du canal reste cationique (P_{Cl}/P_{Na} =0), on observe cependant une diminution de ~4 fois de la perméabilité calcique (P_{Ca}/P_{Na} = 0,56 ± 0,09) par rapport à celle d'un récepteur wild-type ouvert par l'ATP (P_{Ca}/P_{Na} = 2,08 ± 0,22). Par ailleurs, les récepteurs photorégulés sont partiellement perméables au NMDG (P_{NMDG}/P_{Cs} = 0,13 ± 0,02), sans évolution dans le temps (perméabilité identique à 3, 30 et 60s). Enfin, les courants photoinduits sont stables, que ce soit lors d'une irradiation prolongée ou après une irradiation courte, signant une relaxation thermique de l'isomère *cis* plus lente qu'en solution. Ce profil de bistabilité (Figure 4.3) diffère de celui observé sur un récepteur wild-type activé par l'ATP qui, lui, désensibilise au cours de l'application d'ATP.

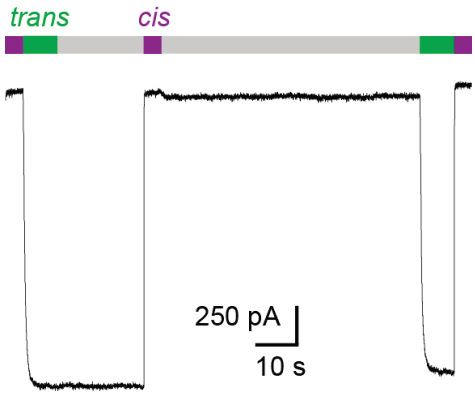


Figure 4.3 : Bistabilité du récepteur photorégulé. Après des irradiations courtes à 525nm et 365nm du récepteur I328C marqué par le MEA-TMA, les courants sont stables dans l'obscurité et reproductibles.

Nous avons ensuite observé l'effet d'une irradiation sur une réponse ATP afin de déterminer si les mécanismes d'ouverture du canal sont communs. De manière surprenante, parmi les deux classes de mutants définies précédemment, les profils observés diffèrent. Au sein des *trans*-opener par exemple certains mutants marqués ont une réponse ATP diminuée par une irradiation à 525nm (I328C) alors qu'elle est diminuée par une irradiation UV sur d'autres (I332C). Cette fois-ci, les résidus des mutants appelés *trans*-bloqueurs sont situés en périphérie et les *cis*-bloqueurs dans un anneau plus interne, suggérant un mécanisme d'obstruction du pore par la charge lors d'une ouverture induite par l'ATP (Figure 4.2.).

Nous avons également testé l'impact de la longueur de la molécule et de la taille de la charge, qui n'ont pas d'influence sur les courants de photorégulation observés. Des molécules neutres ou chargées négativement ont également été testées : le profil de

photorégulation est conservé mais les courants photoinduits sont dramatiquement réduits. Le fait qu'une application ultérieure de MEA-TMA restaure les courants photoinduits (Figure 4.4) suggère que l'absence de charge positive sur les molécules conduit à un défaut de marquage : la charge semble donc importante pour l'accès de la molécule au canal, et joue un rôle modéré dans le mécanisme de photorégulation.

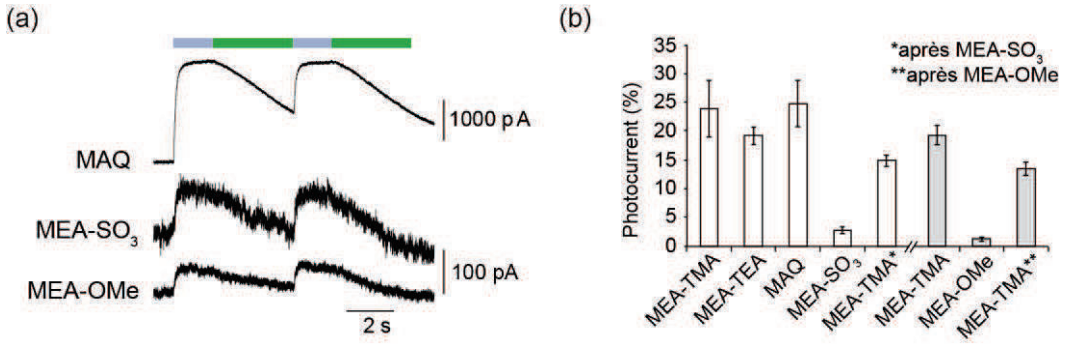


Figure 4.4 : Influence de la taille et de la charge de la molécule sur l'optogating. (a) enregistrements électrophysiologiques sur cellules HEK exprimant le mutant I328C rP2X2-3T et marquées par différentes molécules analogues du MEA-TMA lors d'irradiation à 525 et 365nm. (b) histogramme de la proportion des courants photoinduits à 525nm par rapport à une réponse ATP saturante sur des cellules exprimant le mutant I328C rP2X2-3T et marquées par les différents analogues (200µM, 5min, barres blanches ou 80µM, 5min, barres grises).

Nous avons ensuite ingénieré le récepteur pour le rendre insensible à l'ATP, ceci étant rendu possible par l'introduction d'une mutation dans le site de liaison de l'ATP (K69A sur rP2X2). Marqué par notre molécule, le récepteur LiP2X2R est activable par une irradiation visible et ses propriétés de perméation ne sont pas modifiées (P_{Cl}/P_{Na} = 0, P_{Ca}/P_{Na} = 0,43 ± 0,09, P_{NMDG}/P_{Cs} = 0,14 ± 0,01) par rapport au récepteur I328C marqué par le MEA-TMA. Nos collaborateurs P.-F. Méry et F. Rassendren à l'Institut de Génomique Fonctionnelle (Montpellier) ont alors démontré que cet outil non seulement photorégule l'activité neuronale lorsqu'il est exprimé dans des neurones d'hippocampe de rat en culture (Figure 4.3) mais qu'il permet d'induire des trains de potentiels d'action en lors de l'irradiation dans le visible significativement plus nombreux par rapport à ceux observés à 365nm.

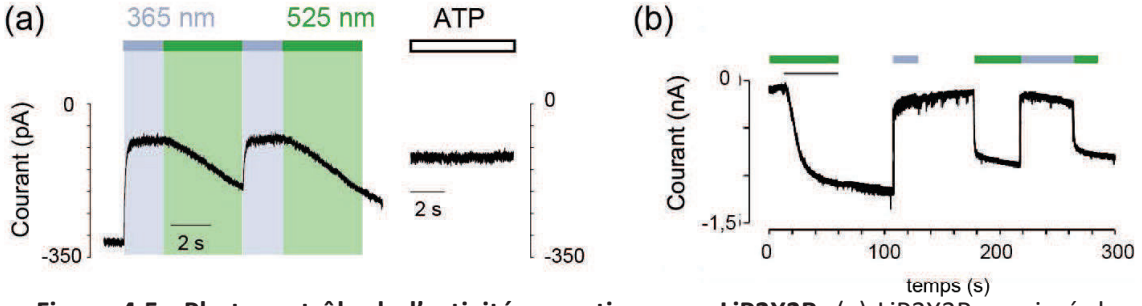


Figure 4.5 : Photocontrôle de l'activité synaptique par LiP2X2R. (a) LiP2X2R exprimé dans les cellules HEK est photorégulable (gauche) et insensible à l'ATP (100µM, droite) (b) photocontrôle de neurones d'hippocampe exprimant LiP2X2R. La barre noire représente l'application de MEA-TMA (100µM).

1.5. Discussion

Au cours de ce projet, nous avons ainsi développé une nouvelle stratégie, appelée optogating, alternative aux PTLs qui permet de photoréguler l'activité neuronale en ciblant le canal ionique et non plus le site de liaison du ligand. Sur les récepteurs P2Xs, perméants aux cations, une des questions principales soulevée par nos résultats est l'importance de la charge positive dans le mécanisme d'ouverture induit par l'isomérisation du MEA-TMA. Au vu des profils de photorégulation obtenus en présence d'ATP, il semblerait que la charge vienne obstruer le passage des ions, dans la mesure où ce sont les résidus les plus externes qui ont un profil de *trans*-bloqueurs : l'isomère long *trans* viendrait positionner la charge au milieu de la voie de perméation alors que l'isomère *cis*, plus court, l'éloignerait et diminuerait la répulsion électrostatique. Cependant, en absence d'ATP, le mécanisme semble être différent dans la mesure où les résidus identifiés comme *trans*-openers ne correspondent pas aux *cis*-bloqueurs et que certains résidus marqués aient une influence sur la réponse ATP mais ne photorégulent pas seuls. Pour tous les mutants photorégulables, la localisation des résidus à l'interface entre les hélices TM2 ou entre TM1 et TM2 suggère plutôt l'importance d'une déstabilisation des interactions inter et/ou intra sous-unités pour le mécanisme d'optogating, qui ne ferait pas intervenir la charge. Cette hypothèse est corroborée par le fait que des isostères neutres ou chargés négativement sont également capables de photoréguler le récepteur avec, certes une efficacité réduite, mais un profil similaire. La présence de la charge positive semble alors favoriser l'accès de la molécule au canal et donc permettre un marquage efficace.

La deuxième question soulevée par ces résultats est la pertinence physiologique de l'ouverture photoinduite. Nous avons démontré que le canal ingénieré restait un canal cationique et que la cinétique d'ouverture était relativement proche de celle induite par l'ATP lorsque la puissance d'irradiation est suffisante. Néanmoins, la perméabilité calcique est diminuée d'un facteur 5 par rapport à un récepteur sauvage alors qu'une perméabilité au NMDG, un gros cation organique, est observée : ces résultats semblent contradictoires. En effet, si la perméabilité cationique est diminuée par une obstruction du pore ou une ouverture moindre que celle induite par l'ATP, comment expliquer une perméabilité aux plus gros cations ? La diminution de la perméabilité calcique peut s'expliquer en partie par le fait que le calcium est un modulateur allostérique négatif du récepteur P2X2, conduisant peut être à une sous-estimation de la perméabilité dans nos conditions. La perméabilité partielle au NMDG signe quant à elle une dilatation partielle du pore ionique. Ce point demande d'autres investigations, notamment des enregistrements en configuration canal unique pour mesurer la conductance unitaire du canal ouvert par une irradiation. On peut également émettre l'hypothèse que les mécanismes de perméation des deux ions au sein du récepteur ne soient pas identiques et que la photorégulation induite par le MEA-TMA les affecte différemment. De plus, nous n'avons pas exploré l'efficacité de marquage et la stœchiométrie de photorégulation. Les courants de photorégulation représentent 25% des courants ATP saturant après 5 minutes de marquage, malheureusement augmenter ce temps de contact fragilise les cellules et rend les expériences d'électrophysiologie impossibles : le marquage s'effectue avec l'isomère *trans* thermodynamiquement stable qui provoque l'ouverture des canaux ce qui induit une entrée continue de cations dans la cellule qui est nocive sur des temps prolongés. Une alternative est un marquage avec l'isomère *cis* mais nous avons rencontré des problèmes techniques de reproductibilité des irradiations. De plus, l'irradiation UV nécessaire à ce marquage est, elle, nocive pour les cellules. Nous ne sommes donc pas en mesure de discriminer entre un marquage incomplet ou une moindre efficacité d'ouverture et les résultats de perméabilité ne sont pas suffisants pour conclure.

Néanmoins, l'outil créé permet de contrôler l'activité du canal avec des propriétés similaires à celles d'un récepteur P2X sauvage et le récepteur ingénieré peut être rendu insensible à son ligand endogène, ce qui permet un contrôle de l'activité du récepteur

exclusivement par la lumière et donc spécifique. Ceci ouvre la voie à des études physiologiques concernant le rôle des différents sous-types au sein d'un système biologique complexe.

1.6. Article 1 : Optical control of an ion channel gate (2013)

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]

[a]Centre 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; [b]Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, F-67400 Illkirch, France; [c]Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34000 Montpellier, France; [d]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U661, F-34000 Montpellier, France; [e]Universités de Montpellier 1 and 2, F-34000 Montpellier, France; [f]Centre National de la Recherche Scientifique, Laboratoire de Biochimie Théorique, F-75005 Paris, France; [g]Université Paris Diderot, F-75005 Paris, France; [h]Laboratory 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

Optogenetic approaches in neuroscience rely on the heterologous expression of engineered light-gated ion channels or pumps to trigger or inhibit electrical activity of selected neurons (1, 2). This powerful and revolutionizing technique provides an exquisite remote control of neuronal circuits that drive behavior in animals. Of special interest is the optogenetic pharmacology (also known as optochemical genetic) (3, 4), which allows the control of an ion channel or receptor function by a photoswitchable ligand that is irreversibly tethered to the genetically modified protein through cysteine substitution (3, 4). Ligands are pharmacologically active substances targeting either competitive (5–7), or noncompetitive binding sites (8–10), and light sensitivity is mostly conferred by substituting a photoisomerizable azobenzene derivative, which interconverts reversibly between a long *trans*-isomer and a short *cis*-isomer (11). However, this approach is technically demanding, as it requires the design of site-specific ligands for each target. The development of versatile methods with generic photoswitchable molecules would thus improve the optochemical strategy.

Here, we present optogating, a unique method for the optical control of ATP-activated P2X channel gating. P2X receptors are a family of trimeric, cation-selective channels (12, 13) comprising seven mammalian subtypes that mediate a variety of physiological responses, including fast synaptic transmission, contraction of smooth muscle, modulation of neurotransmitter release, and pain sensation (12, 14, 15). P2X receptors are considered as emerging therapeutic targets because of their link to cancer (16), inflammatory (17), and neuronal diseases, including neuropathic pain (18). Inspired by previous works showing that chemical modification of the transmembrane (TM) pore region of the P2X2 receptor affects channel gating through labeling of single cysteine mutants by positively charged methanethiosulphonate reagents (19–21), we sought to optically control the gating machinery of the receptor by covalently introducing into the same region positively charged, azobenzene-containing photoswitches. We found that engineered channels could be reversibly turned on and off by light, without the need of ATP, revealing a unique ATP-independent, light-induced gating mechanism. We applied our system in cultured hippocampal neurons, and showed that a light-gated P2X2 receptor that was made genetically insensitive to endogenous ATP rapidly and reversibly photomodulated synaptic activity and action potential firing. These findings establish original tools to delineate P2X receptor signaling in vivo, and provide new opportunities to specifically activate by light other ion channels in which the endogenous sensitivity of the natural signal can be genetically removed.

Results

Design of the Optogating Approach. To design the optogating strategy, we synthesized the sulfhydryl reactive, maleimide ethylene azobenzene trimethyl ammonium derivative (MEA-TMA) (Fig. 1*A* and Fig. S1). This molecule is similar to maleimide azobenzene quaternary ammonium (MAQ), a compound initially developed to optochemically control K^+ channels activity (8). MEA-TMA rapidly photoisomerized in solution from the dark-adapted *trans*-isomer to the *cis*-isomer by using a 365-nm light, and photoswitched back to the *trans*-isomer either rapidly by a 525-nm light or slowly by thermal relaxation (k_BT) in the dark (Fig. S2). We selected 19 residues, including those previously identified (19, 20), from the outer region of transmembrane segments TM1 and TM2 (Table S1), and substituted each of them with a cysteine into the P2X2-3T background, a functional receptor in which three native cysteine residues (one in TM2 and one in each of the two termini) were mutated to threonine (20). Following transient expression in HEK cells, all single cysteine mutants responded robustly to ATP

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.

[1]To 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.

NEUROSCIENCE

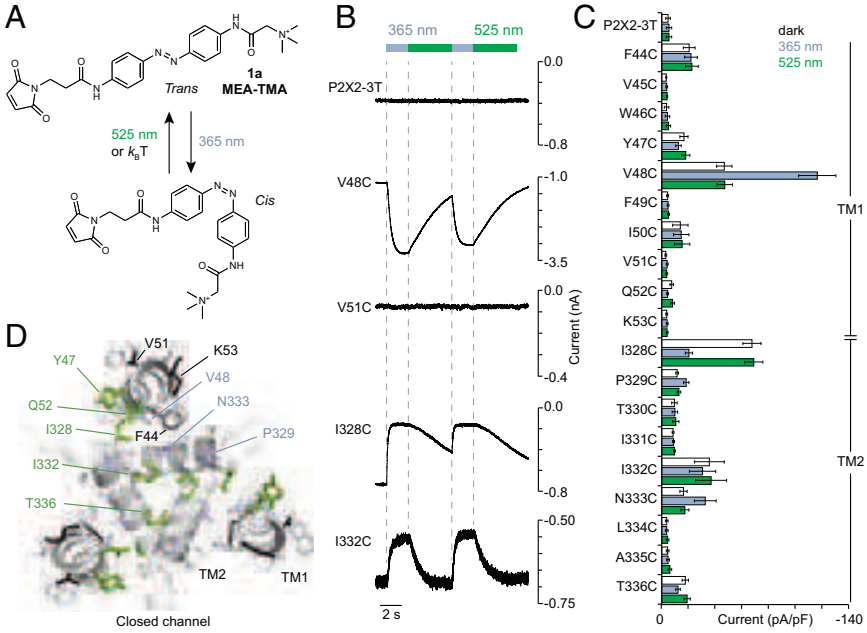


Fig. 1. Tethered MEA-TMA turns on and off the P2X2 channel by light. (*A*) Chemical structure and *cis-trans* isomerization of MEA-TMA. (*B*) Whole-cell currents evoked by light at the indicated wavelengths in HEK cells expressing the indicated constructs that were prior-treated to MEA-TMA in the dark. For V48C, labeling was performed in the presence of ATP. (*C*) Screening for all constructs showing current density recorded in the dark, followed by 365- (violet bars) and 525-nm (green bars) light illuminations (n = 4–7 cells; mean ± SEM). (*D*) Mapping of switchable positions viewed from the extracellular side along the threefold axis of symmetry of a closed-channel state P2X2 homology model reveals *trans*- and *cis*-openers, colored as green and violet sticks, respectively. Gray- and black-colored sticks indicate, respectively, selected and labeled residues with no effect upon light irradiation. TM1 and TM2 α-helices from the same subunit are also indicated.

as determined by patch-clamp electrophysiology, and exhibited half-maximal effective concentrations (EC_{50}) of ATP that were similar to those previously determined (20) (Table S1).

After MEA-TMA labeling in the dark followed by extensive washing (see *Materials and Methods* for labeling procedure), we noticed that cells expressing some mutants displayed, immediately after break-in, a leak of the holding current that could be either decreased (for Y47C, Q52C, I328C, I332C, and T336C mutants) or increased (V48C, P329C and N333C) upon 365-nm light illumination (Fig. 1 *B* and *C*, and Fig. S3). Irradiation at 525 nm reversed these UV-modified holding currents, and repeated toggling between 365- and 525-nm lights robustly switched these currents back and forth, thus revealing potent *cis*- or *trans*-openers. Amplitudes of the light-gated currents depended on the mutant position in the channel, and ranged from small to robust photocurrents (Fig. 1 *B* and *C* and Table S1). In contrast, we did not observe any leak or photoactivation in untreated cells expressing these mutants. Furthermore, treatment of the remaining 11 mutants, including the P2X2-3T, with MEA-TMA did not convey self-photosensitivity to the receptors (Fig. 1 *B* and *C*).

When mapped on the closed-channel state homology model, built from the recent X-ray structure of the zebrafish P2X4 receptor (22), *trans*-openers were placed between TM2 α-helices from two adjacent subunits, whereas *cis*-openers were mostly located between TM1 and TM2 α-helices from the same subunit (Fig. 1*D*). Thus, the optogating method identifies several positions in the P2X2 pore that optically fine-tune the gating machinery of the channel at either short or long wavelength.

For F44C and V48C mutants, substantial leak currents that did not decrease upon light illumination were recorded in the dark (Fig. 1*C* and Table S1). The reason for this result is unclear, but may be related to the fact that the two residues are separated by one-helix turn in TM1 (Fig. 1*D*). As these leak currents were minimal in the absence of MEA-TMA labeling (−8.9 ± 2.1 pA/pF for F44C, and −7.3 ± 3.5 pA/pF for V48C, n = 3–4), and because side-chains of F44 and V48 face TM2 α-helices that form the ion channel in the open state, one may speculate that their chemical modifications by the dark-adapted *trans*-isomer would destabilize interactions between these helices in the closed state, thus producing some channel openings. Additional experiments are needed to clarify this issue.

Tethered Photoswitchable Reagents Rapidly Gate P2X2 Channel. An important requirement to achieve precise optical gating of ion channels is that activation and inactivation kinetics induced by light are in the same range as those observed in physiological conditions. We thus investigated the kinetics of photoactivation and inactivation by measuring time constants (τ) of currents recorded at different wavelengths. Depending on the attachment points in the channel, we found that these constants ranged from 1.38 ± 0.25 to 12.3 ± 3.2 s at 525-nm light, and from 0.090 ± 0.003 to 0.335 ± 0.037 s at 365-nm light (Table S1). However, we observed that increasing 525-nm light intensity from 0.36 to 4.5 mW/mm^2 to cells expressing the I328C mutant, which was one of the slowest mutants to activate at this wavelength, decreased by more than 10-times τ values (from 4.22 ± 0.33 to 0.36 ± 0.02 s, n = 4 cells), but without affecting photocurrent amplitude (Fig. 2 *A* and *B*). These observations show that tethered photoswitches can rapidly gate P2X2 channels (time to reach maximal current is ∼1 s at 4.5 mW/mm^2), although these apparent rates were slower than those previously determined at saturating concentration of ATP (∼80 ms) (23).

A second requirement for an in vivo or ex vivo use is that optical gating of channels remains stable, with little thermo relaxation of the *cis*- to the *trans*-isomer, in particular in the closed-channel state. We thus analyzed whether photo-induced closed state was stable in the absence of illumination by measuring for I328C mutant currents recorded in the dark. Channel closure achieved by the *cis*-isomer was stable in the dark for at least 60 s, until 525-nm illumination again promoted channel opening (Fig. 2*C*). These results indicate that the kinetics of thermal relaxation from the *cis*- to the *trans*-isomer measured in solution are considerably slowed down once bound to the protein. In addition, when receptors were turned on by 525-nm illumination, channels remained open in the dark for at least 20 s (Fig. 2*C*). These persistent effects demonstrate bistability of the optogating method, a key feature that was already observed for other receptors (6, 24); it allows tethered azobenzenes to remain in the dark either in their *cis* or *trans* isomer following brief illuminations. These data establish a stable photocontrol of channels.

Tethered Photoswitchable Reagents Modulate ATP Responses. To explore the mechanisms underlying light activation, we first investigated the effect of light on responses elicited by ATP (measured at the EC_{50}). All mutants that were endowed with light sensitivity in ATP-free solutions displayed consistent *trans*- or *cis*-blockage of the ATP-evoked responses, except Q52C and N333C mutants, for which switching light had no detectable effect on

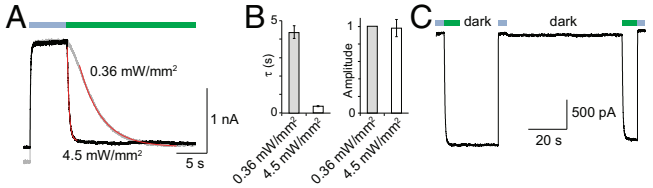


Fig. 2. Kinetics and bistability of azobenzene isomerization attached at the I328C mutant. (*A*) Increasing 525-nm light intensity (green bar) to a cell expressing the I328C mutant tethered to MEA-TMA increases activation rates of whole-cell current. Data were fitted by single exponential decay functions (in red). (*B*) Bar plot summarizing data presented in *A* shows substantial change of time constant (τ) but not of light-induced current amplitude (normalized to 0.36 mW/mm^2) (n = 4 cells; error bars are SEM). (*C*) Bistability of light-induced currents revealed in the dark following brief photoactivation at 525 nm (green bars, light intensity was set to 4.5 mW/mm^2) and brief inactivation at 365 nm (violet bars) in a cell expressing the I328C mutant tethered to MEA-TMA. Note that the basal current is stable in the dark until a new photoactivation of similar amplitude occurs.

ATP currents (Fig. 3*A*, Fig. S3, and Table S1). From a homology model of an open-channel state built from the ATP-bound crystal structure (22), all *trans*-blockers of ATP-evoked currents were positioned at an external ring from the central threefold axis of symmetry, whereas most of the *cis*-blockers were positioned at a more internal ring (Fig. 3*B*). These results are consistent with the hypothesis that the positive charge of MEA-TMA repels cation flux through the conducting pathway, through a mechanism that closely depends upon the relative distance to the open pore induced by ATP. In particular, docking of MEA-TMA on the active-state's model of the I328C mutant showed that the ability of the charge to occupy the constriction of the pore depended on the isomerization of the azobenzene (Fig. S4).

Next, we compared the mapping of photoswitchable positions recorded in the presence of ATP with that measured in its absence (compare Fig. 1*D* with Fig. 3*B*). A clearly different pattern of positions was revealed. First, *trans*-isomers tethered to Y47C or the I328C mutant opened the channel in the absence of ATP, but blocked ATP currents in its presence, indicating a state-dependent action of MEA-TMA (Figs. 1*B* and 3*A*, and Fig. S3). A detailed ATP dose–response analysis for the I328C mutant confirmed that the *trans*-isomer reduced by up to 68 ± 6% the maximal ATP currents with a slight increase of ATP potency ($EC_{50\text{–}525\ nm}$ = 1.5 ± 0.4 μM; $EC_{50\text{–}365\ nm}$ = 2.8 ± 0.7 μM, n = 5 cells) (Fig. 3*C*). Second, photoswitches tethered to the V51C and K53C mutants were not openers in ATP-free solution, but modified ATP responses, demonstrating that these labeled residues are unable to induce substantial photoactivation on their own (Figs. 1*B* and 3*A*, and Fig. S3). Because V51 and K53 residues are located more extracellularly in the channel than I328, these data suggest that the direct photoactivation acts further downstream from this position, most likely at the level of the TM α-helices where critical residues have been identified as important for gating (19, 20, 25, 26). Taken together, these data support the existence of two light-gated mechanisms occurring independently: one that is produced in the presence of ATP and acts through a pore-blocking mechanism, and a second one that occurs without the need of ATP and acts directly on the gate of the channel.

Exploring the Light-Gated, ATP-Independent Mechanism. To further gain insight into the ATP-independent, light-gated mechanism, we assessed the ability of a series of synthesized azobenzene derivatives, including MAQ (8), that differ in their structure and formal charge to directly gate the channel (Fig. 4*A* and Fig. S1). We focused on the I328C mutant because it displayed the largest and more stable light-gated currents. Neither the length of the spacer arm nor the size of the positively charged group changed the photoactivation yield of the *trans*-opener compared with a saturating concentration of ATP (Fig. 4 *B* and *C*). In contrast, reversing the sign of the formal charge by substituting TMA with a sulfonate group (SO_3^-) dramatically affected photocurrent yield, but subsequent application of MEA-TMA essentially restored currents, suggesting that the level of MEA-SO_3 labeling was low (Fig. 4 *B* and *C*). This result is not surprising because negatively charged MEA-SO_3 has to cross a highly acidic extracellular vestibule to access the pore before labeling (22, 27). Increasing time incubation (up to 20 min) or concentration (1 mM) of MEA-SO_3 did not improve labeling yields. We obtained similar results with the noncharged compound MEA-OMe (Fig. 4), further emphasizing the critical role of the positive charge in efficient labeling.

Regardless of the labeling yields and, consequently, of current amplitudes, the qualitative similarity of photocurrents recorded with tethered compounds carrying either opposite or no charge suggests that isomerization of the azobenzene core is critical to the light-induced mechanism (Fig. 4*B*). We conclude from these experiments that the presence of the positive charge of photoswitch compounds enables efficient labeling of engineered receptors, and that toggling of tethered photoswitches promotes channel gating.

A Light-Gated, ATP-Insensitive Channel Conducts Cations. Our data show that engineered P2X2 receptors can be activated by light without the need of ATP. Based on this observation, we designed another construct that did not sense ATP, providing the opportunity

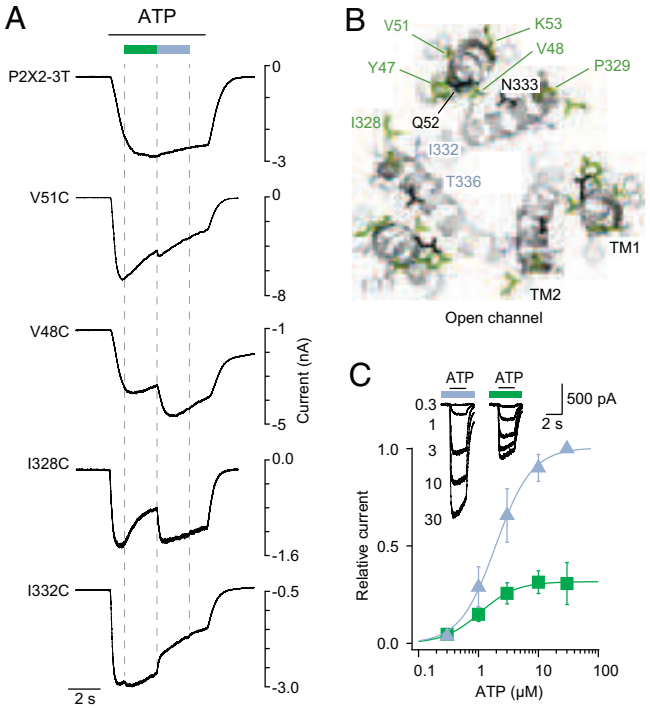


Fig. 3. Tethered MEA-TMA photomodulates ATP response of P2X2 channels. (*A*) Whole-cell currents evoked by ATP (EC_{50}) modulated by light in the same cells as those shown in Fig 1*B*. For I328C and I332C, cells were prior-irradiated with a short 4-s lasting pulse of 365-nm light to induce channel closure. (*B*) Same view as in Fig. 1*D*, in which *trans*- and *cis*-blockers colored, respectively, as green and violet sticks, are mapped on a P2X2 model in an ATP-bound, open-channel state. Gray- and black-colored sticks indicate, respectively, selected and labeled residues with no effect upon light irradiation on ATP response. (*C*) ATP dose–response curves recorded at 365-nm (violet) and at 525-nm light (green) from cells expressing the I328C mutant tethered with MEA-TMA (n = 5 cells; mean ± SEM). Currents were normalized to 30 μM ATP at 365 nm. (*Inset*) Typical superimposed ATP traces at the indicated illumination wavelengths.

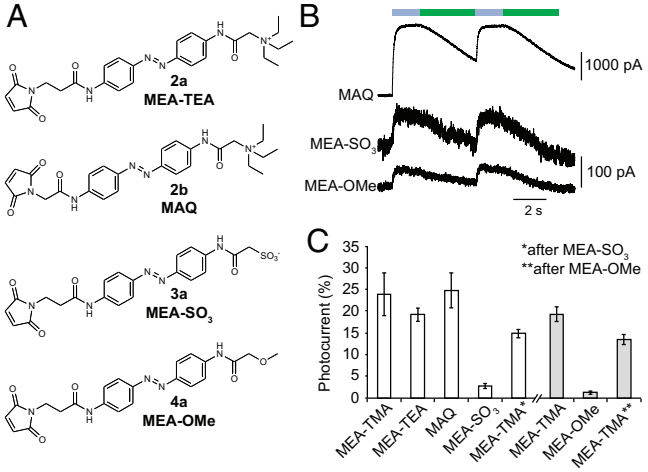


Fig. 4. Critical role of the photoswitch-positive charge for labeling P2X2 channels. (*A*) Chemical structures of MEA-TMA analogs. (*B*) Whole-cell currents evoked by light in cells expressing the I328C mutant tethered with MAQ, MEA-SO_3, or MEA-OMe, as indicated. (*C*) Bar plot showing photocurrent amplitudes elicited by 525-nm light normalized to currents evoked by a saturating concentration of ATP (recorded at 365-nm light) in cells expressing the I328C mutant tethered to the indicated MEA-TMA analogs. Labeling was performed with either 200 μM (white bars) or 80 μM (gray bars) of the analogs (n = 3–7 cells; mean ± SEM).

to express in neurons a light-gated P2X receptor devoid of endogenous activation. We introduced into the I328C background the K69A mutation, which is known to abolish ATP binding (28, 29), and showed that, as expected, no ATP current was measured although robust light-gated currents were still recorded following MEA-TMA treatment (Fig. 5*A*). We then asked whether the channel still conducts cations, because recent work has shown that introduction of positive charge into the pore, through mutation of residue T339 into lysine, converts the channel from being cation-selective to anion-preferring (30). We found that both MEA-TMA–tethered mutants I328C and K69A/I328C were still permeable to sodium and calcium ions (although calcium permeability was less than that measured for the WT P2X2 receptor) (31), but not to chloride ions (30, 32) (Fig. 5*B*, Fig. S5, and Tables S2 and S3), indicating that tethered MEA-TMA molecules do not alter cation selectivity of the channel.

P2X2 receptors are well known for undergoing "pore dilation" after prolonged ATP application, a process defined by increased permeability to large organic cations, such as *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) (12, 33, 34). To determine whether light-gated receptors were also able to undergo such pore dilation following light illumination, we measured NMDG permeability 3, 30, and 60 s after light-switching at 525-nm. A small but instantaneous permeation of NMDG was detected that did not change during time illumination ($P_{NMDG}/P_{Cs} \leq 0.17$), whereas in control conditions a progressive increase of NMDG permeation was recorded following prolonged ATP application for the P2X2-3T receptor (Fig. 5*B*, Fig. S6, and Table S4). These data indicate that light-gated channels open cation-selective pores that are partially in dilated states.

Application of Optogating in Neurons. Finally, we expressed the K69A/I328C mutant in dissociated hippocampal neurons, which express P2X2 receptors (35, 36), and triggered MEA-TMA activation in the absence of putative chronic effects induced by ATP exposure. Excitation per se had no effect on background neuronal currents (Fig. 5*C*). Brief application of MEA-TMA induced robust inward currents which were rapidly and reversibly driven upon further light exposures at either 525 nm or 365 nm (Fig. 5*C*). Importantly, the currents did not change significantly when turning lights off, further demonstrating bistability of the optogating method in neurons (Fig. 5*D*). The modulation of the light-gated channels not only induced a P2X2-like current in the absence of ATP, but it also subsequently modulated the synaptic activity and action-potential firing of the hippocampal neurons (Fig. 5 *C*, *E*, and *F*). Thus, these data pave the way for dissecting in vivo the physiological and pathological roles of P2X receptors at an unprecedented level of precision.

Discussion

This study presents optogating, a unique optogenetic method in which the gating machinery of a P2X channel is reprogrammed to respond to light, enabling optical manipulation of neuronal activity. Optogating differs from current optogenetic approaches

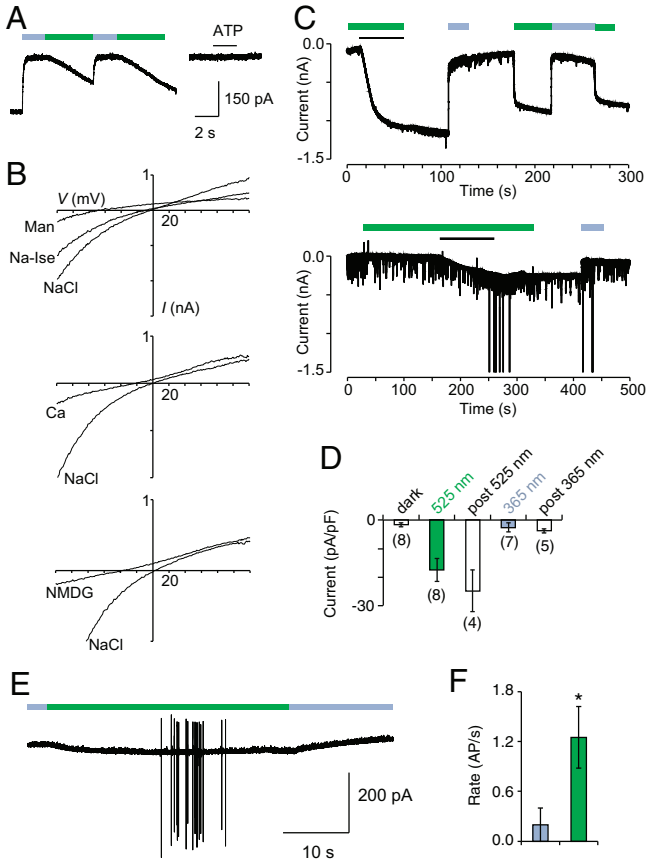


Fig. 5. An ATP-insensitive light-gated cation channel drives synaptic activity and action potential firing in neurons. (*A*) The K69A/I328C mutant tethered to MEA-TMA responds to light (*Left*), but not to ATP (*Right*, 100 μM) in HEK cells. (*B*) Current-voltage curves for the same construct recorded in different extracellular solutions in HEK cells (Man, mannitol; Na-Ise, sodium isethionate; Ca, calcium). Light-gated currents were obtained after subtracting photocurrents recorded at 525-nm light (intensity was set to 4.5 mW/mm^2) to those obtained at 365-nm light (for NMDG, current shown was recorded 60 s after light switching). (*C*) Whole-cell current from two example recordings (with moderate and robust synaptic activities) evoked by light in hippocampal neurons expressing the K69/I328C mutant following brief application of 100 μM MEA-TMA (solid lines). (*D*) Bar plot summarizing the recorded current densities (mean ± SEM for the indicated number of experiments). (*E*) Extracellular recording from hippocampal neurons expressing the K69/I328C mutant showing action-potential (AP) firing triggered by 525-nm light illumination. Cells were labeled with MEA-TMA (30 μM) under 365-nm light to maintain channels in nonconducting states. (*F*) Bar plot summarizing AP rates, defined as the number of AP per second, recorded under 365-nm light (violet bar) and 525-nm light (green bar) in experiments similar to that shown in *E* (n = 4, mean ± SEM). Rates, calculated every 5 s, were collected just before 525-nm excitation, and at the peak, within the first minute of the 525-nm excitation. Measurement of statistical significance is based on paired Student t tests; $^*P < 0.05$.

in several ways. Optogating targets the TM gating machinery of the receptor that is known to drive opening and closing of the pore; in a sense, it substitutes ATP stimulation. Unlike optogenetic pharmacology, optogating uses photoswitchable reagents that do not target an active site. Thus, this versatile method can be extended in principle to any ion channels. More importantly, optogating relies on the possibility that receptors can be activated by light even if important biologically active or regulatory sites were genetically modified. This feature sharply contrasts with other optically controlled ligand-gated channels, such as glutamate (LiGluR) (5), $GABA_A$ (10), and nicotinic receptors (LinAChR) (6) in which endogenous neurotransmitters can still activate engineered receptors. Optogating thus provides a unique opportunity to study in native tissues the specific contribution of light-mediated signaling that is not imbalanced by the endogenous stimulus.

An important issue relies on the specificity of the optogating strategy. We showed that brief application of moderate concentrations of MEA-TMA (30–100 μM) onto neurons rapidly activated engineered channels, suggesting that this compound devoid of pharmacological specificity is quite selective in activating engineered channels. We also provide evidence that this selectivity arises from the presence of a positive charge carried by the photoswitch reagents. Although the precise stoichiometry of labeling remains unknown, our data indicate that positively charged reagents are attracted by the negatively charged vestibule located just above the pore (22, 27), enabling a covalent reaction between the maleimide and the target cysteine. The proximity-induced reaction is reminiscent of that occurring with photoswitchable affinity-labeled compounds (3, 4), ensuring the specificity of the optogating method to selectively target engineered P2X2 channels in vivo.

The qualitative similarity of the photocurrents recorded with compounds carrying either opposite or no charge suggests that toggling of tethered photoswitches is critical to the light-induced mechanism that occurs independently of ATP. We thus favor the hypothesis that the large *trans*-azobenzene repulses adjacent TM2 α-helices, resulting in pore opening, whereas the bent-shape, short *cis*-isomer enables tight association of TM2 α-helices that is necessary for closing the pore, as revealed recently by X-ray structures (22, 27) (Fig. S7). Although this proposal deserves further experimental testing, we do not exclude the possibility that the positive charge also contributes to this light-gated mechanism.

Bistability can be achieved by tethered azobenzene derivatives (3). Bistability provides a simple and nonphototoxic means to control neuronal activity by a brief pulse of light that maintains the receptor in its last tuned state for an extended period in the dark, until activity is reversed by another pulse of light of different wavelength. This landmark property is conserved in the optogating strategy, which would be suitable for in vivo applications and behavioral experiments, as previously demonstrated for other azobenzene-containing compounds (7, 37–39).

Some P2X receptors, including P2X2, are known to undergo pore dilation after prolonged application of ATP (12, 33, 34). Defined by a progressive increase (in the tens of seconds) in permeability to large organic cations, such as NMDG and propidium dyes, this process is distinct from the fast opening of the channel that occurs in the millisecond time range. Although the underlying mechanisms remain controversial (12), recent works favor a model in which pore dilation involves intrinsic conformational changes of the protein (40–42). We found that light-gated receptors open cation-selective pores that appear to be partially and stably (for at least 60 s) in dilated states, suggesting that pore-widening induced by tethered photoswitches falls between the small and large cation-selective pores.

The wide distribution of P2X2 receptors in the hippocampus (35, 43), and their established role in the regulation of excitatory neurotransmitter release onto CA1 stratum radiatum interneurons (36), stimulates the investigation of light-gated P2X receptors in neurons. We demonstrated that these engineered channels drive synaptic activity and action potential firing in hippocampal neurons rapidly and reversibly, paving the way for further studying P2X2 signaling in the brain at an unprecedented level of precision. In addition, extension of light-gated receptors to other P2X receptors, in particular to P2X4 and P2X7—two key important components involved in neuropathic pain and chronic inflammation (17, 18)—opens new possibilities for exploring the molecular links between P2X function and these debilitating disorders.

Materials and Methods

Chemical Synthesis. Synthesis of photoswitches is detailed in *SI Materials and Methods*.

Photoswitch Labeling. All photoswitch compounds except MEA-OMe were dissolved in water to make a stock solution (1–2 mM) and diluted in standard extracellular solution to 200 μM for labeling. For MEA-OMe, a solution of 80 μM was prepared in standard extracellular solution containing 1% dimethyl sulfoxide (DMSO). Increasing time incubation of MEA-TMA or MEA-OMe to 20 min prevented seal formation in the whole-cell configuration.

Molecular Modeling. Models of the rat P2X2 receptor in the active and closed state have been prepared by homology modeling using the structure of *Danio rerio* P2X4 receptor, obtained in the presence (PDB ID code 4DW1) and absence of ATP (PDB ID code 4DW0) (22) as templates, and using the software Modeler. For the I328C mutant shown in Fig. S4, the resulting model of the activated state has been superimposed with the 4DW1 structure available in the Orientations of Proteins in Membranes database (44) to get its symmetry axis superimposed with the *z* axis. Docking was then performed with the software AUTODOCK (45) with a constraint on the position of the charged nitrogen, which was imposed to be on the *z* axis successively at $z = 8$, 4, 0, and −4.

Molecular Biology and Gene Expression in Cultured Cells. Mutations were introduced into the rat P2X2 cDNA in the pcDNA3.1 expression vector as previously described (46). cDNAs encoding I328C and K69A/I328C mutants were further subcloned in the pBi-CMV3 ZsGreen bidirectional promoter vector (Clontech). All mutations were confirmed by DNA sequencing. HEK-293 cells were cultured and transiently transfected with the pcDNA3.1 vectors (0.05–0.3 μg) and a green fluorescent protein cDNA construct (0.3 μg), as described previously (46). Cultured hippocampal neurons were transfected with 1.5-μg pBi-CMV3 ZsGreen plasmids for 24–48 h, using a calcium phosphate method optimized for highly mature neuronal cultures (47).

Patch-Clamp Electrophysiology of Cultured HEK Cells. HEK-293 whole-cell patch-clamp electrophysiology was performed at room temperature (22–24 °C) 24–48 h after transfection (46). Before recordings, cells were incubated in standard extracellular solution containing a 200 μM photoswitch for 5 min in the dark at room temperature, followed by extensive wash. For mutants that showed no photoactivation effect, ATP (at the EC_{50}) was included during labeling because it is known that it increases the accessibility of residues located deep within the pore (20). Patch pipette of resistance between 3 and 5 MΩ were filled with intracellular solutions containing 140 mM CsCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. The standard extracellular solution contained 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. All solutions were maintained at ∼300 mOsm. Cells were voltage-clamped to −60 mV (unless otherwise indicated) using the EPC10 (HEKA) amplifier and data were digitized online using PATCHMASTER software (HEKA). Illumination of cells was achieved with Primatix's collimated LEDs directly coupled to the microscope. The system contained an UHP-Mic-LED-525 and a Mic-LED-365 with an output of 525 and 365 nm, respectively. Discrete wavelengths of light (± 5 nm) were focused on cells with a Plan Fluorite 40×, 0.6 NA objective lens (Olympus). Objective lens output intensity was measured with an integrating sphere photodiode power sensor (S142C, PM100D; Thorlabs). The measured output intensities for wavelengths for 365 and 525 nm were, respectively, 2.4 and 0.36 mW/mm^2 (unless otherwise indicated). The LEDs were controlled with TTL signals generated by the EPC10 patch-clamp amplifier. Data were fitted with a single-exponential decay equation: $I_t = I_\infty + A \exp(-t/\tau)$, where I_∞ and A are the residual current and maximal amplitude, respectively, t is the time in seconds, and τ is the time constant in seconds. ATP dose–response curves were determined as previously described (46).

Neuronal Culture. Primary cultures of hippocampal neurons were prepared as previously described (48). Briefly, hippocampi were dissected from embryonic

NEUROSCIENCE

day 18 rat embryos, digested with 0.05% trypsin and hippocampal cells were seeded at a density of 12,000/cm^2 on poly-D-lysine (50 μg/mL; Sigma) precoated coverslips. Neurons were cultured in neurobasal medium supplemented with 2% (vol/vol) B27 (Invitrogen), 2 mM L-glutamine (Sigma), 100 U/mL Penicillin and 100 μg/mL Streptomycin antibiotics (Gibco).

Electrophysiological Recordings in Cultured Neurons. The neurons were continuously perfused with an extracellular solution containing 140 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, 3 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM glucose adjusted to pH 7.4 with NaOH and to 330 mOsm with Na-acetate (22–24 °C), as previously described (49). Recording pipettes were pulled from borosilicate glass and had a resistance of 3–5 MΩ when filled with a solution containing 115 mM $CsMeSO_3$, 20 mM CsCl, 10 mM Hepes, 0.6 mM EGTA, 4 mM Na_2-ATP, 0.4 mM Na-GTP, 10 mM Na-phosphocreatine, and 2.5 mM $MgCl_2$, adjusted to pH 7.2 with CsOH and to 300 mOsm with Cs-acetate (modified from ref. 50). Mature (14–16 d in vitro) hippocampal neurons expressing the transfection marker ZsGreen were visualized and recorded with the patch-clamp technique, as previously described (51). After establishing the whole-cell configuration, MEA-TMA (100 μM) was briefly applied onto the neuron from a glass pipet, located at <100-μm distance from the cell body. Steady-state light-sensitive currents at −60 mV were modulated by either exposure to UV light (350 ± 25 nm) or to green light (525 ± 25 nm) of a 100 W HBO lamp (Zeiss FluoArc). The procedure was the same for extracellular recordings of action potentials (49), except that the electrodes (2–5 MΩ) were filled with 130 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM Hepes, 10 mM Glucose, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, pH 7.4 with NaOH (295 mOsm adjusted with NaCl), and that recordings were performed when tip resistance reached 100 MΩ. MEA-TMA (30 μM) was briefly applied onto the neuron, as described above.

Relative Permeability Measurements. The procedure is detailed in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. The authors thank Prof. Maurice Goeldner and Dr. Thierry Chataigneau for helpful discussion, and Dr. Federica Bertaso for critical reading of the manuscript and helpful discussion. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Ministère de la Recherche, the International Center for Frontier Research in Chemistry, and the Agence Nationale de la Recherche (ANR 11 BSV5 001-01).

1. Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* 8(1):26–29.
2. Gorostiza P, Isacoff EY (2008) Optical switches for remote and noninvasive control of cell signaling. *Science* 322(5900):395–399.
3. Fehrentz T, Schönberger M, Trauner D (2011) Optochemical genetics. *Angew Chem Int Ed Engl* 50(51):12156–12182.
4. Kramer RH, Mourot A, Adesnik H (2013) Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. *Nat Neurosci* 16(7):816–823.
5. Volgraf M, et al. (2006) Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat Chem Biol* 2(1):47–52.
6. Tochitsky I, et al. (2012) Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Chem* 4(2):105–111.
7. Levitz J, et al. (2013) Optical control of metabotropic glutamate receptors. *Nat Neurosci* 16(4):507–516.
8. Banghart M, Borges K, Isacoff E, Trauner D, Kramer RH (2004) Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. *Nat Neurosci* 7(12):1381–1386.
9. Sandoz G, Levitz J, Kramer RH, Isacoff EY (2012) Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA (B) signaling. *Neuron* 74(6):1005–1014.
10. Yue L, et al. (2012) Robust photoregulation of GABA(A) receptors by allosteric modulation with a propofol analogue. *Nat Commun* 3:1095.
11. Szymański W, Beierle JM, Kistemaker HA, Velema WA, Feringa BL (2013) Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chem Rev* 113(8):6114–6178.
12. Khakh BS, North RA (2012) Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. *Neuron* 76(1):51–69.
13. Jiang R, Taly A, Grutter T (2013) Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. *Trends Biochem Sci* 38(1):20–29.
14. Kaczmarek-Hájek K, Lörinczi E, Hausmann R, Nicke A (2012) Molecular and functional properties of P2X receptors—Recent progress and persisting challenges. *Purinergic Signal* 8(3):375–417.
15. Burnstock G (2008) Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. *Nat Rev Drug Discov* 7(7):575–590.
16. White N, Burnstock G (2006) P2 receptors and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27(4): 211–217.
17. Di Virgilio F (2007) Liaisons dangereuses: P2X(7) and the inflammasome. *Trends Pharmacol Sci* 28(9):465–472.
18. Beggs S, Trang T, Salter MW (2012) P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. *Nat Neurosci* 15(8):1068–1073.
19. Rassendren F, Buell G, Newbolt A, North RA, Surprenant A (1997) Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J* 16(12): 3446–3454.
20. Li M, Chang TH, Silberberg SD, Swartz KJ (2008) Gating the pore of P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 11(8):883–887.
21. Jiang LH, Rassendren F, Spelta V, Surprenant A, North RA (2001) Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X (2) receptor. *J Biol Chem* 276(18):14902–14908.
22. Hattori M, Gouaux E (2012) Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. *Nature* 485(7397):207–212.
23. Trujillo CA, et al. (2006) Inhibition mechanism of the recombinant rat P2X(2) receptor in glial cells by suramin and TNP-ATP. *Biochemistry* 45(1):224–233.
24. Gorostiza P, et al. (2007) Mechanisms of photoswitch conjugation and light activation of an ionotropic glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(26):10865–10870.
25. Li Z, Migita K, Samways DS, Voigt MM, Egan TM (2004) Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. *J Neurosci* 24(33):7378–7386.
26. Cao L, Broomhead HE, Young MT, North RA (2009) Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. *J Neurosci* 29(45):14257–14264.
27. Kawate T, Michel JC, Birdsong WT, Gouaux E (2009) Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. *Nature* 460(7255):592–598.
28. Cao L, Young MT, Broomhead HE, Fountain SJ, North RA (2007) Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. *J Neurosci* 27(47):12916–12923.
29. Jiang R, et al. (2012) Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. *EMBO J* 31(9):2134–2143.
30. Browne LE, et al. (2011) P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. *Nat Neurosci* 14(1):17–18.
31. Evans RJ, et al. (1996) Ionic permeability of, and divalent cation effects on, two ATP-gated cation channels (P2X receptors) expressed in mammalian cells. *J Physiol* 497(Pt 2):413–422.
32. Bo X, et al. (2003) Pharmacological and biophysical properties of the human P2X5 receptor. *Mol Pharmacol* 63(6):1407–1416.
33. Khakh BS, Bao XR, Labarca C, Lester HA (1999) Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. *Nat Neurosci* 2(4):322–330.
34. Virginio C, MacKenzie A, Rassendren FA, North RA, Surprenant A (1999) Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. *Nat Neurosci* 2(4):315–321.
35. Rubio ME, Soto F (2001) Distinct localization of P2X receptors at excitatory postsynaptic specializations. *J Neurosci* 21(2):641–653.
36. Khakh BS, Gittermann D, Cockayne DA, Jones A (2003) ATP modulation of excitatory synapses onto interneurons. *J Neurosci* 23(19):7426–7437.
37. Wyart C, et al. (2009) Optogenetic dissection of a behavioural module in the vertebrate spinal cord. *Nature* 461(7262):407–410.
38. Caporale N, et al. (2011) LiGluR restores visual responses in rodent models of inherited blindness. *Mol Ther* 19(7):1212–1219.
39. Szobota S, et al. (2007) Remote control of neuronal activity with a light-gated glutamate receptor. *Neuron* 54(4):535–545.
40. Chaumont S, Khakh BS (2008) Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(33):12063–12068.
41. Yan Z, Li S, Liang Z, Tomić M, Stojilkovic SS (2008) The P2X7 receptor channel pore dilates under physiological ion conditions. *J Gen Physiol* 132(5):563–573.
42. Browne LE, Compan V, Bragg L, North RA (2013) P2X7 receptor channels allow direct permeation of nanometer-sized dyes. *J Neurosci* 33(8):3557–3566.
43. Masin M, Kerschensteiner D, Dümke K, Rubio ME, Soto F (2006) Fe65 interacts with P2X2 subunits at excitatory synapses and modulates receptor function. *J Biol Chem* 281(7):4100–4108.
44. Lomize MA, Lomize AL, Pogozheva ID, Mosberg HI (2006) OPM: Orientations of proteins in membranes database. *Bioinformatics* 22(5):623–625.
45. Morris GM, et al. (2009) AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* 30(16):2785–2791.
46. Jiang R, et al. (2010) A putative extracellular salt bridge at the subunit interface contributes to the ion channel function of the ATP-gated P2X2 receptor. *J Biol Chem* 285(21):15805–15815.
47. Jiang M, Chen G (2006) High Ca2+-phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc* 1(2):695–700.
48. Belly A, et al. (2010) CHMP2B mutants linked to frontotemporal dementia impair maturation of dendritic spines. *J Cell Sci* 123(Pt 17):2943–2954.
49. Moutin E, et al. (2012) Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability. *J Cell Biol* 198(2):251–263.
50. Adesnik H, Scanziani M (2010) Lateral competition for cortical space by layer-specific horizontal circuits. *Nature* 464(7292):1155–1160.
51. Baccam N, et al. (2007) Dual-level afferent control of growth hormone-releasing hormone (GHRH) neurons in GHRH-green fluorescent protein transgenic mice. *J Neurosci* 27(7):1631–1641.

Supporting Information

Lemoine et al. 10.1073/pnas.1318715110

SI Materials and Methods

Chemical Synthesis. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich or Alfa Aesar in analytical grade. An Agilent 6975 MSD was used for electrospray ionization (ESI) analysis. ^{1}H-NMR and ^{13}C-NMR were run at 300 or 400 and 75 or 100 MHz, respectively. Coupling constants (*J*) are quoted in hertz (Hz) and chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) using the residue solvent peaks as reference relative to tetramethylsilane (TMS); s is singlet, d is doublet, t is triplet, q is quadruplet, m is multiplet. A Beta-Basic C^{18} column from Thermo Scientific (10 × 250 mm) was used for HPLC semipreparative purifications. Synthesis of maleimide ethylene azobenzene trimethyl ammonium (MEA-TMA), maleimide ethylene azobenzene triethyl ammonuim (MEA-TEA), maleimide azobenzene quaternary ammonium (MAQ), MEA-SO_3, and MEA-OMe was carried out as follows.

(E)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamide **S1a**: O-Benzotriazole-*N*,*N*,*N'*,*N'*-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU) (893 mg, 2.36 mmol) was added to a solution of (3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoic acid (399 mg, 2.36 mmol), which was obtained as described previously (1), 4-[(E)-2-(4-aminophenyl)diazen-1-yl]aniline (417 mg, 1.96 mmol) and triethylamine (0.327 mL, 238 mg, 2.36 mmol) in 10 mL of MeCN. The reaction was carried out for 19 h under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated in vacuo, dissolved in AcOEt (150 mL), quenched with 150 mL of saturated $NaHCO_3$aq, then extracted with AcOEt (2 × 150 mL). The crude product was purified by column chromatography on silica (heptane/EtOAc, 1/1–2/8 in vol), resulting in the desired orange solid (392 mg, 1.08 mmol, 55%). TLC (EtOAc/heptane, 7/3): Rf = 0.34; ^{1}H-NMR (400 MHz, DMSO - d_6): δ 10.23 (s, H), 7.70 (s, 2H), 7.62 (d, *J* = 8,7 Hz, 4H), 7.04 (s, 2H), 6.67(d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.02 (s, 2H), 3.74 (t, J^3 = 7.2 Hz, 2H), 2.63 (t, J^3 = 7.2 Hz, 2H); ^{13}C-NMR (100 MHz, Acetone - d_6): δ = 171.38, 169.37, 155.63, 152.86, 149.72, 145.08, 135.26, 125.65, 123.52, 120.30, 114.65, 42.07, 41.34; MS (ESI) (*m*/*z*): $[M+H]^+$ calculated for $C_{19}H_{18}N_5O_3$ 364.14; found, 364.2.

(*E*)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamide **S1b**: The **S1b** orange solid (480 mg, 1.37 mmol, 70%) was obtained from 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetic acid (365 mg, 2.36 mmol), which was obtained as described previously (1), using the same method as with **S1a.** TLC (EtOAc/heptane, 7/3): Rf = 0.35; ^{1}H-NMR (400 MHz, Acetone - d_6): δ 9.77 (s, 1H), 7.79 (s, 4H), 7.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 4.40 (s, 2H); ^{13}C-NMR (100 MHz, DMSO - d_6): δ 171.16, 165.08, 153.02, 148.84, 143.32, 140.07, 135.47, 125.37, 123.05, 119.94, 113.90, 38.73; MS (ESI) (*m*/*z*): $[M+H]^+$ calculated for $C_{18}H_{16}N_5O_3$ 350.12; found, 350.

(*E*)-2-((4-((4-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-*N*,*N*,*N*-trimethyl-2-oxoethanaminium 2,2,2-trifluoroacetate **MEA-TMA** (**1a**): 1-carboxy-*N*,*N*,*N*-trimethylmethanaminium chloride (74 mg, 0.48 mmol) was dissolved in 10 mL of anhydrous DMF. Then, oxalyle chloride (35 mL, 0.48 mmol) was added under argon atmosphere at room temperature. After 2 h, at this temperature, a solution of **S1a** (106 mg, 0.29 mmol) and DIPEA (0.153 mL, 0.88 mmol) in 10 mL of anhydrous DMF was added. The mixture was allowed to stir 19 h at room temperature. Concentration in vacuo afforded a thick orange solid, which was diluted with water (50 mL) and then washed with AcOEt (3 × 50 mL). The aqueous phase was concentrated and purified by semipreparative reverse-phase HPLC using an isocratic elution mode of H_2O (with 0.1% TFA)/MeCN, 75/25 (vol/vol) resulting in the desired orange solid (retention time 10.3 min, 113 mg, 0.196 mmol, 67%). ^{1}H-NMR (400 MHz, D_2O): δ 10.91 (s, 1H), 10.40 (s, 1H), 7.86 (m, 8H), 7.04 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 3.74 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.31 (s, 9H), 2.67 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H). MS (ESI) (*m*/*z*): $[M]^+$ calcd for $C_{24}H_{27}N_6O_4$ 463.21; found, 463.20; UV/Vis: λ_{max} 365 nm.

(*E*)-2-((4-((4-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-*N*,*N*,*N*-triethyl-2-oxoethanaminium 2,2,2-trifluoroacetate **MEA-TEA, 2a**: The **2a** orange solid (51.1 mg, 0.083 mmol, 49%) was obtained after semipreparative reverse-phase HPLC using an isocratic elution mode of H_2O (with 0.1% TFA)/MeCN, 68/32 (vol/vol) (retention time 9.3 min) with *N*-(carboxymethyl)-*N*-ethyl-*N*-methylethanaminium bromide (2) (75 mg, 0.33 mmol), oxalyle chloride (29 μL, 0.33 mmol), **S1a** (60 mg, 0.165 mmol), and DIPEA (110 μL, 0.66 mmol) using the same method as with **1a.** ^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD - d_4): δ 7.92 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.87 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.79, (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.83 (s, 2H), 4.20 (s, 2H), 3.69 (q, *J* = 8.0 Hz, 6H), 3.65 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.40 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H). MS (ESI) (*m*/*z*): $[M]^+$ calculated for $C_{27}H_{33}N_6O_4$ 505.26; found, 505.2; UV/Vis: λ_{max} 365 nm.

(*E*)-2-((4-((4-(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-*N*,*N*,*N*-triethyl-2-oxoethanaminium 2,2,2-trifluoroacetate **MAQ** (**2b**): The **2b** orange solid (39 mg, 0.065 mmol, 32%) was obtained after semipreparative reverse-phase HPLC using an isocratic elution mode of H_2O (with 0.1% TFA)/MeCN, 68/32 (vol/vol) (retention time 8.6 min) with *N*-(carboxymethyl)-*N*-ethyl-*N*-methylethanaminium bromide (2) (90 mg, 0.40 mmol), oxalyle chloride (34 μL, 0.40 mmol), **S1b** (70 mg, 0.20 mmol), and DIPEA (140 μL, 0.80 mmol) using the same method as with **1a.** ^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD - d_4): δ 7.90 (m, 4H), 7.77 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.94 (s, 2H), 4.38 (s, 2H), 4.19 (s, 2H), 3.68 (q, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.39 (t, *J* = 8.0 Hz, 9H). MS (ESI) (*m*/*z*): $[M]^+$ calculated for $C_{26}H_{31}N_6O_4$ 491.24; found, 491.2; UV/Vis: λ_{max} 365 nm.

(*E*)-2-((4-((4-(3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanamido)phenyl)diazenyl)phenyl)amino)-2-oxoethanesulfonate **MEA-SO_3 (3a): S1a** (135 mg, 0.365 mmol), 2-sulfoacetic acid (56 mg, 0.40 mmol) benzotriazol-1-yl-oxytripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyBOP) (228 mg, 0.438 mmol) and DIPEA (178 μL, 1.023 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous DMF under argon atmosphere at room temperature. The mixture was allowed to stir 19 h at room temperature. Concentration in vacuo afforded a thick orange solid, which was diluted with water (50 mL) and then washed with AcOEt (3 × 50 mL). The aqueous phase was concentrated and purified by semipreparative reverse-phase HPLC using an isocratic elution mode of H_2O (with 0.1% TFA)/MeCN, 80/20 (vol/vol) resulting in the desired orange solid (retention time 14.2 min, 120 mg, 0.247 mmol, 68%). ^{1}H-NMR (400 MHz, MeOD - d_4): δ 7.86 (m, 4H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.70 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.83 (s, 2H), 3.89 (m, 4H), 2.70 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H). MS (ESI) (*m*/*z*): $[M]^-$ calculated for $C_{21}H_{18}N_5O_7S$ 484.09; found, 484.0; UV/Vis: λ_{max} 365 nm.

(*E*)-3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(4-((4-(2-methoxyacetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)propanamide **MEA-OMe (4a)**: **S1a** (32 mg, 0.089 mmol), methoxyacetic acid (9 μL, 0.116 mmol) HBTU (40 mg, 0.107 mmol) and triethylamine (15 μL, 0.107 mmol) were dissolved in 10 mL of anhydrous acetonitrile under argon atmosphere at room temperature. The mixture was allowed to stir 19 h at room temperature. The solution was concentrated in vacuo, dissolved in AcOEt (150 mL), quenched with 150 mL of saturated $NaHCO_3$aq, then extracted with AcOEt (2 × 150 mL). The crude

product was purified by semipreparative reverse-phase HPLC using an isocratic elution mode of H_2O (with 0.1% TFA)/MeCN, 68/32 (vol/vol) resulting in the desired orange solid (retention time 12.1 min, 35 mg, 0.08 mmol, 90%). ^{1}H-NMR (400 MHz, Acetone - d_6): δ 10.34 (s, 1H), 10.10 (s, 1H), 7.85 (m, 8H), 7.04 (s, 2H), 3.74 (t, J =7.3 Hz, 2H), 3.40 (s, 3H), 2.65 (t, J = 7.3 Hz, 2H). MS (ESI) (m/z): $[M\text{-}H]^-$ calculated for $C_{22}H_{20}N_5O_5$ 434.15; found, 434.0; UV/Vis: λ_{max} 365 nm.

Relative Permeability Measurements. An agar bridge containing 3 M KCl connected the bath and indifferent electrode. The intracellular (pipette) solution comprised 147 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH, or 140 mM CsCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with CsOH. The standard extracellular solution was changed to symmetrical NaCl external solution that contained 147 NaCl, 0.3 mM $CaCl_2$, 13 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH, and a voltage ramp pulse (from −120 to 120 mV; 200-ms duration) was applied. The solution was then exchanged with one of the following solutions, and another voltage ramp was applied: mannitol (Man) solution, in which most NaCl was replaced by mannitol to maintain osmolarity contained 40 mM NaCl, 0.3 mM $CaCl_2$, 200 mM mannitol, 13 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH; sodium isethionate solution (Na-Ise) contained 10 mM NaCl, 137 sodium isethionate, 0.3 mM $CaCl_2$, 13 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH; $CaCl_2$ (Ca) solution contained 110 mM $CaCl_2$, 3 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with $Ca(OH)_2$, and *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) solution contained 149 mM NMDG, 0.3 mM $CaCl_2$, 13 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with HCl. For NMDG, voltage ramps were applied 3, 30, and 60 s after light-switching (light intensity for 525 nm was 4.5 mW/mm^2) or ATP (100 μM) application. For light-gated currents, we calculated reversed potential (E_{rev}, mV) from voltage ramps after subtracting photocurrents obtained at 525-nm light to those recorded at 365-nm light. Similarly, for ATP-gated currents, E_{rev} was determined after subtracting currents evoked by ATP [at the indicated concentration, and for the Ca solution 300 μM was used to account for the decreased ATP potency (3)] at 365-nm light to basal currents recorded at the same wavelength in the absence of ATP. Values of E_{rev} were then corrected for liquid junction potentials, which were calculated using IGOR PRO (v6.22A), and used to determine permeability ratios ($P_X/P_{cations}$) as follows: For low NaCl concentration solution, $P_{Cl}/P_{Na} = ([Na]_o \times \exp(-x) - [Na]_i)(1 - \exp(x))/ ([Cl]_i - [Cl]_o \times \exp(x))(1 - \exp(-x))$, where $x = \Delta E_{rev} \times 10^{-3} \times F/RT$ (ΔE_{rev} is the difference between E_{rev} measured in solution for a specific ion X and E_{rev} measured in symmetrical NaCl solution, F is Faraday constant, R is the gas constant, and T is the absolute temperature), $[Na]_o = 44$, $[Na]_i = 157$, $[Cl]_o = 41$, and $[Cl]_i = 147$ mM. In these conditions, the theoretical E_{rev} value for chloride-impermeable channels would be −32 mV. For $CaCl_2$ solution, $P_{Ca}/P_{Na} = ([Na]_i \times \exp(x))(1 + \exp(x))/(4 \times [Ca]_o)$, where $[Na]_i = 157$, and $[Ca]_o = 112$ mM. For the NMDG solution, $P_{NMDG}/P_{Cs} = ([Cs]_i \times \exp(x))/[NMDG]_o$, where $[Cs]_i = 148$, and $[NMDG]_o = 147$ mM. Ion concentrations were converted to activities using the following coefficients: $\gamma_{Na} = 0.75$, $\gamma_{Cl} = 0.75$, $\gamma_{Ca} = 0.28$, $\gamma_{Cs} = 0.75$, $\gamma_{NMDG} = 0.81$. The E_{rev} shown in Fig. 5, and Figs. S5 and S6 are raw data without the correction of junction potential.

1. Allen VC, Robertson CC, Turega SM, Philp D (2010) A simple network of synthetic replicators can perform the logical OR operation. *Org Lett* 12(9):1920–1923.
2. Ōkawa H, et al. (2013) Proton-conductive magnetic metal-organic frameworks, NR3 (CH2COOH)[M(a)(II)M(b)(III)(ox)3]: Effect of carboxyl residue upon proton conduction. *J Am Chem Soc* 135(6):2256–2262.
3. Migita K, Haines WR, Voigt MM, Egan TM (2001) Polar residues of the second transmembrane domain influence cation permeability of the ATP-gated P2X(2) receptor. *J Biol Chem* 276(33):30934–30941.

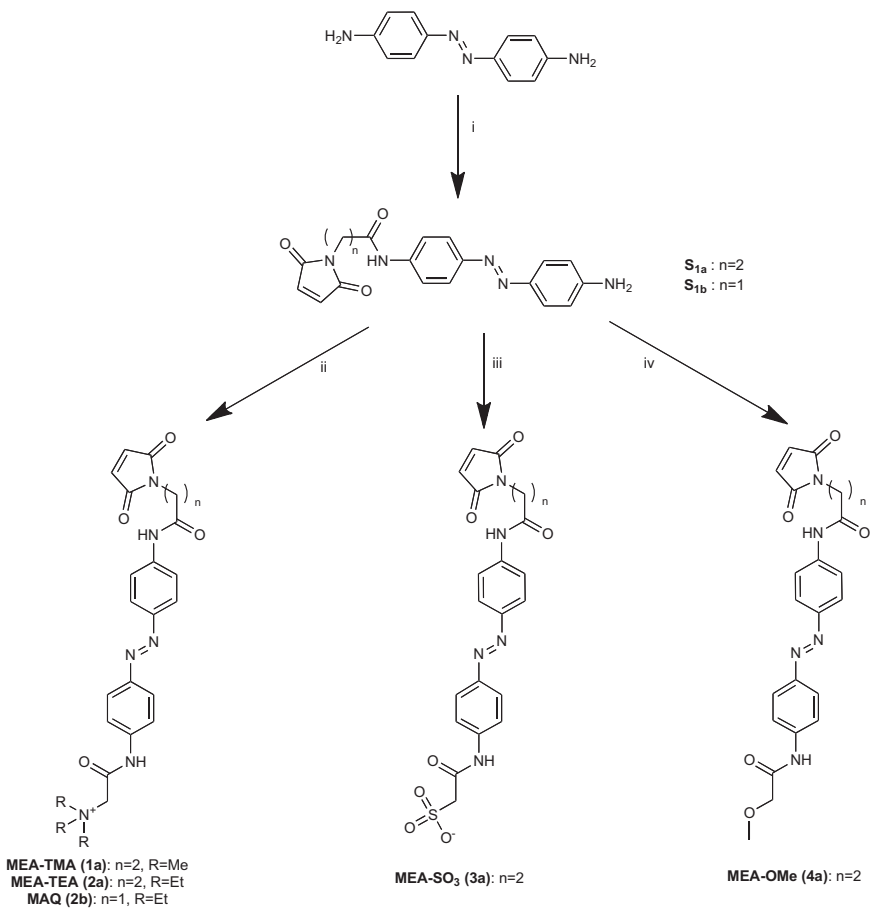


Fig. S1. Synthesis of MEA-TMA, MEA-TEA, MAQ, MEA-SO_3 and MEA-OMe. (*i*) HBTU, Et_3N, (3-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)propanoic acid or 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetic acid, MeCN, 19 h, room temperature, ρ = 55–70%; (*ii*) 1-carboxy-*N*,*N*,*N*-trimethylmethanaminium chloride or *N*-(carboxymethyl)-*N*-ethyl-*N*-methylethanaminium bromide, oxalyle chloride, DMF, 2 h, room temperature; **S1a** or **S1b**, DIPEA, DMF, 19 h, room temperature, ρ = 32–67%; (*iii*) 2-sulfoacetic acid, PyBOP, DIPEA, DMF, 19 h, room temperature, ρ = 68%; (*iv*) methoxyacetic acid, HBTU, Et_3N, MeCN, 19 h, room temperature, ρ = 90%.

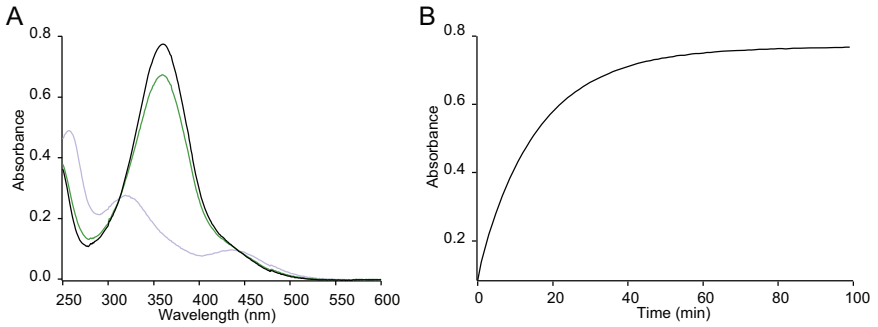


Fig. S2. Kinetics of azobenzene isomerization measured in free solution. (*A*) Absorbance spectra of MEA-TMA recorded: (*i*) in standard extracellular solution in the dark (black trace), (*ii*) following 365-nm light illumination for 3 min (violet trace), and (*iii*) after 525-nm irradiation for 3 min (green trace). (*B*) Thermal relaxation, recorded at 360 nm, of *cis*–MEA-TMA in standard extracellular solution fitted with a single exponential decay function (τ = 16.3 ± 0.9 min, *n* = 3, mean ± SEM).

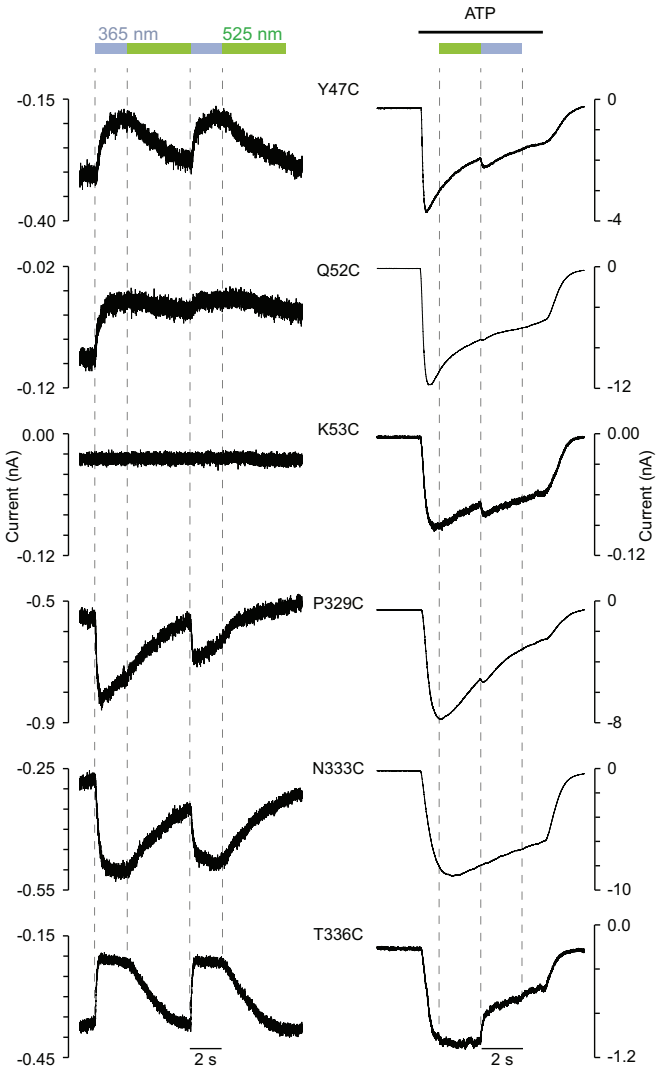


Fig. S3. Tethered MEA-TMA turns on and off the P2X2 channel by light. Whole-cell currents evoked by light or ATP (EC_{50}) in cells expressing the indicated constructs that were prior-treated to MEA-TMA in the dark. Currents were recorded from the same cells. To switch off channels that opened in visible light (for Y47C, Q52C, and T336C mutants), cells were first irradiated with a short 4-s lasting pulse of 365-nm light before ATP application. For Q52C, K53C, N333C, and T336C mutants, labeling was performed in the presence of ATP.

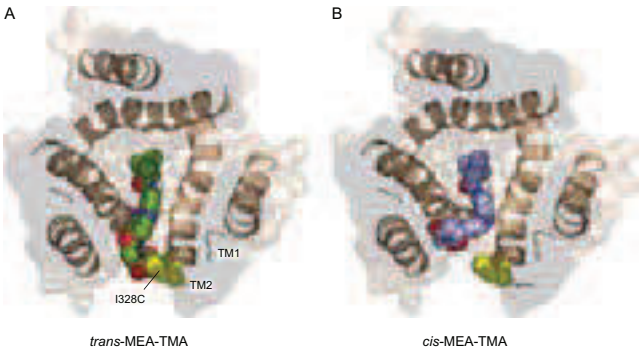


Fig. S4. Docking of MEA-TMA in the rat P2X2 I328C mutant model built from the X-ray structure of the zebrafish P2X4 receptor solved in an ATP-bound, open-channel state. (*A*) The *trans*-isomer spans the distance between the I328C mutation (as indicated in yellow) and the central threefold axis of symmetry where ions are thought to flow. (*B*) The *cis*-isomer, which is shorter than the *trans* one, cannot span this distance, suggesting that once attached to the cysteine, the quaternary ammonium TMA cannot reach the central axis necessary for efficient blockage.

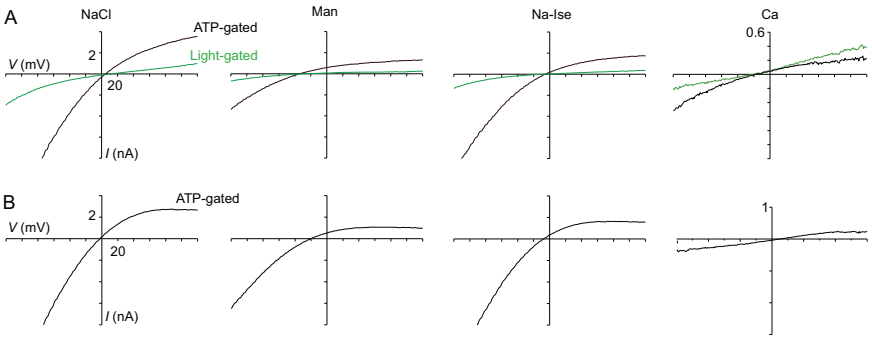


Fig. S5. Light-gated P2X2 receptor is permeable to sodium and calcium ions but not to chloride ions. (*A*) Current-voltage curves for ATP-gated (3 μM or 300 μM for Ca solution) (black) or light-gated (525 nm) (green) currents recorded in HEK cells expressing the I328C mutant tethered to MEA-TMA in different extracellular solutions. Light-gated currents were obtained after subtracting photocurrents recorded at 525-nm light to those obtained at 365-nm light. ATP-gated currents were obtained after subtracting ATP currents recorded at 365-nm light to basal currents recorded at the same wavelength (*Materials and Methods*). (*B*) Current-voltage curves for ATP (10 μM or 300 μM for Ca solution)-gated currents recorded in HEK cells expressing the P2X2-3T receptor at the indicated extracellular solutions as shown in *A*.

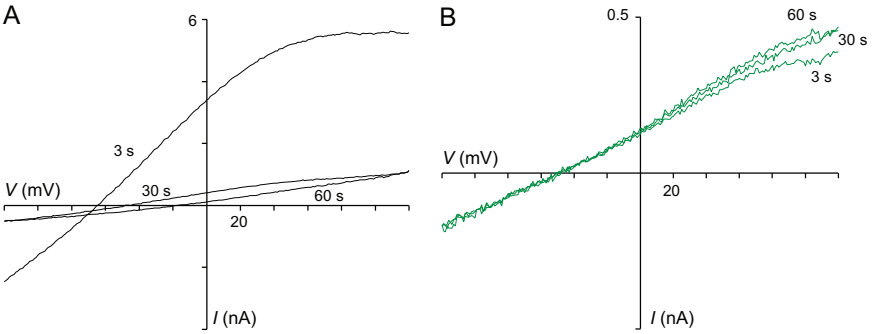


Fig. S6. Light-gated P2X2 receptors display small permeability to NMDG ions. (*A*) Current-voltage curves for ATP-gated (100 μM) currents recorded in NMDG solution at the indicated time after ATP application, in a HEK cell expressing the P2X2-3T receptor. (*B*) Current-voltage curves for light-gated (current at 525 nm subtracted from that at 365 nm) currents recorded at the same times as those shown in *A* after light-switching, in a HEK cell expressing the I328C mutant tethered to MEA-TMA.

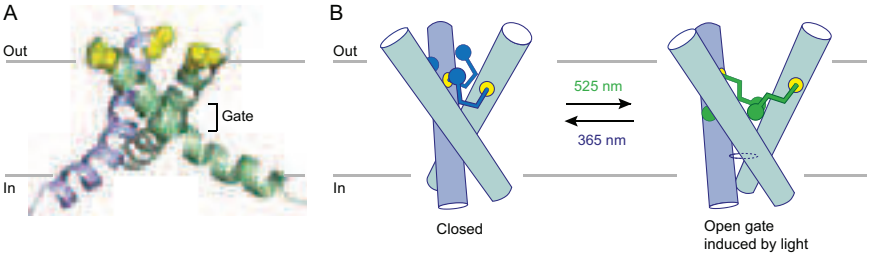


Fig. S7. Proposed light-induced gating mechanism at position I328. (*A*) Lateral view of the P2X4 channel from the crystal structure solved in the closed state (PDB ID code 4DW0). The gate is formed by tight association of the three transmembrane (TM) 2 α-helices from each subunit that are steeply angled (about 50°) relative to the normal of the membrane plane. For clarity, TM1 segments were removed and residue I336, which is homologous to the P2X2 I328 is highlighted in yellow. (*B*) Scheme illustrating for the P2X2 receptor the proposed mechanism in which isomerization of photoswitches tethered to I328C (yellow) forces adjacent TM2 α-helices to move apart, causing pore expansion. For clarity, three attached MEA-TMA molecules are shown, but no assumption on labeling stoichiometry is made. The view is similar to that shown in *A*.

Table S1. Characterization and screening of P2X2 single cysteine mutants with MEA-TMA

Constructs	ATP EC_{50} (μM)	n_H	Dark (pA/pF)	365 nm (pA/pF)	525 nm (pA/pF)	$\tau_{365\ nm}$ (s)	$\tau_{525\ nm}$ (s)
P2X2-3T	15.0 ± 2.0	2.9 ± 0.5	−5.0 ± 1.8	−5.8 ± 1.9	−5.9 ± 1.9	—	—
F44C	1.1 ± 0.4	1.3 ± 0.2	−21.1 ± 4.5	−22.3 ± 4.6	−22.9 ± 4.8	—	—
V45C	9.7 ± 0.8	1.6 ± 0.4	−3.6 ± 0.5	−4.0 ± 0.6	−4.5 ± 0.5	—	—
W46C	12.4 ± 3.1	1.8 ± 0.4	−4.2 ± 1.6	−4.9 ± 1.7	−5.4 ± 1.8	—	—
Y47C	2.5 ± 0.9	1.1 ± 0.1	−17.0 ± 2.9	−13.0 ± 2.1	−18.4 ± 3.0	0.253 ± 0.027	2.774 ± 0.115
V48C	9.4 ± 4.7	1.6 ± 0	−47.0 ± 5.6	−116.7 ± 13.9	−47.3 ± 5.6	0.335 ± 0.037	3.127 ± 0.200
F49C	6.8 ± 0.9	1.6 ± 0.3	−4.8 ± 0.7	−5.1 ± 0.6	−5.5 ± 0.6	—	—
I50C	15.6 ± 2.6	1.8 ± 0.4	−14.1 ± 5.7	−14.8 ± 5.8	−15.5 ± 5.6	—	—
V51C	32.8 ± 6.6	1.5 ± 0.2	−3.4 ± 0.7	−4.3 ± 0.8	−4.2 ± 0.8	—	—
Q52C	93.9 ± 13.8	1.7 ± 0.1	−7.7 ± 1.2	−4.7 ± 0.8	−8.6 ± 1.3	0.323 ± 0.067	12.302 ± 3.230
K53C	19.3 ± 9.0	1.8 ± 0.6	−3.9 ± 0.8	−4.5 ± 0.8	−4.5 ± 0.8	—	—
I328C	5.1 ± 0.9	1.3 ± 0.1	−67.8 ± 6.7	−20.7 ± 2.7	−69.1 ± 6.8	0.095 ± 0.004	4.986 ± 0.426
P329C	7.2 ± 1.0	0.9 ± 0.1	−11.7 ± 1.1	−18.5 ± 1.9	−13.2 ± 1.2	0.109 ± 0.017	3.946 ± 0.579
T330C	10.2 ± 1.6	1.5 ± 0.2	−9.9 ± 2.2	−10.2 ± 2.2	−10.9 ± 2.3	—	—
I331C	19.8 ± 3.8	1.8 ± 0.2	−8.9 ± 0.8	−9.1 ± 0.8	−9.7 ± 0.8	—	—
I332C	9.6 ± 3.0	1.0 ± 0.1	−36.1 ± 11.3	−30.8 ± 9.7	−37.3 ± 11.5	0.180 ± 0.023	1.382 ± 0.248
N333C	9.2 ± 4.2	2.2 ± 1.0	−16.7 ± 2.8	−33 ± 8.3	−17.5 ± 2.9	0.191 ± 0.008	3.861 ± 0.740
L334C	9.8 ± 3.2	1.4 ± 0.3	−4.0 ± 0.9	−4.1 ± 0.9	−4.8 ± 0.9	—	—
A335C	12.1 ± 2.8	1.7 ± 0.1	−4.8 ± 1.0	−5.2 ± 1.1	−6.4 ± 1.4	—	—
T336C	25.7 ± 8.8	1.2 ± 0.2	−18.1 ± 2.5	−12.6 ± 1.7	−19.4 ± 2.5	0.090 ± 0.003	5.581 ± 0.295

All photoactive mutants were labeled in the absence of ATP, except for V48C, Q52C, K53C, N333C, and T336C, in which labeling was performed in the presence of ATP (EC_{50}). All data are mean ± SEM, n = 3–7 from at least two transfections. τ is the time constant determined at the indicated wavelength.

Table S2. Relative ion permeability for chloride

	Light-gated				ATP-gated			
Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Man (mV)	E_{rev} Na-Ise (mV)	P_{Cl}/P_{Na}	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Man (mV)	E_{rev} Na-Ise (mV)	P_{Cl}/P_{Na}
P2X2-3T	—	—	—	—	−4.3 ± 5.4	−32.5 ± 9.4	1.2 ± 5.9	0.10 ± 0.14
I328C	−1.0 ± 7.8	−38.1 ± 6.9	−2.4 ± 7.4	0 ± 0	−2.5 ± 5.9	−29.0 ± 6.1	−0.5 ± 4.6	0.09 ± 0.04
K69A/I328C	−11.8 ± 8.7	−49.0 ± 7.1	−12.9 ± 7.4	0 ± 0	—	—	—	—

Data represent mean ± SEM, n = 4–6 cells from at least two transfections. For the P2X2-3T receptor and the I328C mutant, ATP concentration was, respectively, 10 and 3 μM.

Table S3. Relative ion permeability for calcium

	Light-gated			ATP-gated		
Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Ca (mV)	P_{Ca}/P_{Na}	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Ca (mV)	P_{Ca}/P_{Na}
P2X2-3T	—	—	—	7.7 ± 3.6	9.2 ± 2.8	2.08 ± 0.22
I328C	−7.1 ± 3.2	−29.6 ± 1.9	0.56 ± 0.09	−7.2 ± 3.3	−17.9 ± 2.3	1.04 ± 0.13
K69A/I328C	0.7 ± 1.4	−27.0 ± 5.2	0.43 ± 0.09	—	—	—

Data represent mean ± SEM, n = 4–6 cells from at least two transfections. For P2X2-3T receptor and I328C mutant, ATP concentration was, respectively, 10 and 3 μM in NaCl solution. For Ca solution ATP concentration was 300 μM for both constructs.

Table S4. Relative ion permeability for NMDG

		E_{rev} NMDG (mV)			P_{NMDG}/P_{Cs}		
Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	3 s	30 s	60 s	3 s	30 s	60 s
ATP-gated							
P2X2-3T	−9.8 ± 5.7	−73.7 ± 5.5	−60.7 ± 10.0	−49.1 ± 10.5	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.06
Light-gated							
I328C	−5.5 ± 1.0	−58.2 ± 3.5	−50.8 ± 6.0	−54.9 ± 3.4	0.13 ± 0.02	0.17 ± 0.05	0.13 ± 0.02
K69A/I328C	1.5 ± 5.8	−52.0 ± 8.2	−56.9 ± 8.3	−59.8 ± 7.6	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.02

Data represent mean ± SEM, n = 3–4 cells from at least two transfections. ATP concentration was 100 μM for P2X2-3T.

2. Exploration des mécanismes d'optogating et d'optoblocking

2.1. Stratégie

Suite aux différentes questions soulevées par la stratégie d'optogating, nous avons décidé d'explorer plus en détail les mécanismes mis en jeu, et, notamment, la stoechiométrie nécessaire, d'une part, à l'activation par la lumière de notre récepteur et d'autre part, celle nécessaire à l'optoblocking (photorégulation des courants ATP). Nous souhaitons également accéder à des données d'efficacité de marquage. Pour ce faire, nous avons conçu des concatémères sur lesquels nous pouvons contrôler l'insertion des mutations : un gène unique, formé par la répétition du gène monomérique, permet d'obtenir les trois sous-unités du récepteur reliées par des linkers polypeptidiques. Nous sommes donc capables d'introduire la mutation I328C sur une, deux ou trois sous-unités et de déterminer la position d'insertion. Par manque de temps, je n'ai pas pu faire tous les tests moi-même sur ces constructions et une des étudiantes en master du laboratoire m'a secondé dans ce travail.

2.2. Matériel et Méthodes

Conception des concatémères

La construction du concatémère rP2X2 sauvage a été réalisée en trois étapes comme décrit par Browne et al. (Browne et al., 2011) et insérée dans le vecteur pcDNA3.1(+). Une étiquette d'épitope-EE est insérée à l'extrémité Cterminale de chaque sous-unité. Pour insérer une mutation, chaque séquence codant pour un monomère est extraite du concatémère par des enzymes de restriction spécifiques et insérée dans un vecteur, la mutagénèse dirigée est alors réalisée comme décrit précédemment et les séquences sont vérifiées par séquençage puis l'ADN codant la sous-unité mutée réinséré par ligation dans le concatémère. Dans un premier temps, le concatémère rP2X2-3T (C9T, C348T, C430T) a été produit puis la mutation I328C a été introduite.

Biochimie des concatémères : expression en surface

Les cellules TSA-201, transfectées la veille avec 5µg de plasmide sont incubées 30 minutes avec 2 mM de sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)éthyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotine, Pierce) dans du PBS+ froid contenant 154 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,2 mM Na_2HPO_4,

1,47 mM KH_2PO_4, pH 8, supplémenté de 1 mM $MgCl_2$ and 0,4 mM $CaCl_2$. Les cellules sont rapidement rincées au PBS+ et incubées 10 minutes avec une solution de Tris 20 mM dans du PBS+ pour éliminer l'excès de Sulfo-NHS-SS-Biotine. Après trois lavages, les cellules sont solubilisées dans 200 µL de tampon de lyse (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 20 mM HEPES, pH 7.4, contenant des inhibiteurs de protéases (Roche Applied Science)), et incubées 2h à 4°C sous forte agitation. Les lysats sont clarifiés par centrifugation à 14000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant est ajouté à 50 µL de billes de Neutravidine-Agarose (thermoScientific) préalablement lavées au tampon de lyse et incubé toute la nuit à 4°C. Les billes sont alors incubées à 95°C pendant 10min avec 40 µL de LDS sample buffer (Invitrogen) contenant 70mM de DTT. Les échantillons de protéines de surface sont chargés sur gel SDS-PAGE (4-15%, Biorad) afin de faire migrer les protéines par électrophorèse dénaturante (150 V, 1h30). Les échantillons sont transférés par western-blot grace à une cellule de transfert semisec à 25V pendant 35 minutes. La membrane de nitrocellulose est saturée par du TPBS (PBS suppléé de 1% protéines de lait, 0.5% albumine de sérum bovin et 0.05% Tween 20) et incubée pendant 2h avec un anticorps polyclonal de lapin Glu-Glu conjugué à une peroxidase (EYMPME) dilué au 1/5000 dans du TPBS, et lavée trois fois avec du TPBS. Les bandes de protéines sont révélées avec un kit de détection ECL (GE Healthcare).

2.3. Résultats

Dans un premier temps, toutes les constructions ont été exprimées en cellules TSA-201 et nous avons vérifié qu'elles s'exprimaient en surface sous la forme de trimères, puis nous avons vérifié leur fonctionnalité par électrophysiologie patch-clamp sur des cellules HEK-293. Aucune dégradation n'est observable sur gel SDS-PAGE (Figure 4.6) et toutes les constructions répondent de façon satisfaisante à l'ATP. Par manque de temps, nous n'avons pas mesuré les EC_{50} mais avons vérifié qu'une concentration de 100µM d'ATP est saturante. Après incubation par notre molécule MEA-TMA et une courte irradiation dans l'UV pour basculer toutes les molécules en configuration *cis*, nous avons enregistré les courants électrophysiologiques induits par des irradiations à 525 et 365nm, puis par une concentration saturante d'ATP (Figure 4.6).

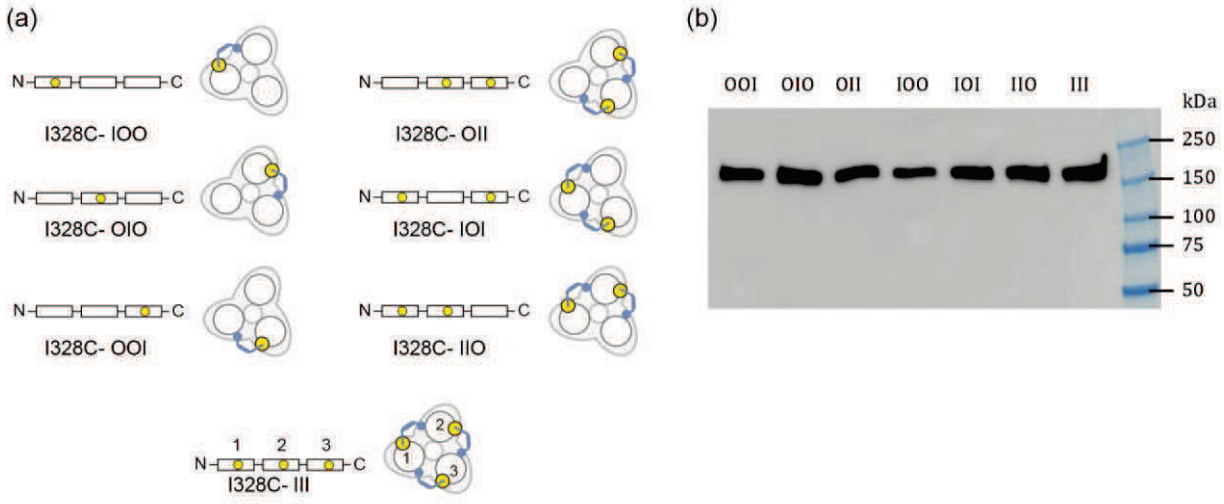


Figure 4.6 : Expression en surface des constructions concatémères I328C rP2X2-3T. (a) représentation schématique des combinaisons de concatémères I328C rP2X2-3T. I représente la présence de la mutation I328C sur la sous-unité, O le résidu sauvage. (b) gel SDS-PAGE des protéines de surface en cellules TSA-201. Aucune dégradation n'est visible et les protéines migrent à une distance compatible avec le poids moléculaire attendu (160kDa).

Notre construction contrôle est le concatémère I328C (III) rP2X2-3T. En termes de nomenclature sur ces constructions I représente la présence d'une cystéine en position I328, O le résidu naturel. Nous obtenons un courant de photorégulation à 525nm de 9% par rapport à un courant ATP saturant (300µM), plus faible que celui observé sur le récepteur trimérique I328C rP2X2-3T (25%) mais suffisant pour la suite de l'étude. Lorsque l'on diminue le nombre de résidus cystéines, on observe une diminution de l'intensité des courants de photorégulation indépendante de la position à laquelle la mutation est introduite : pour deux cystéines insérées, les courants représentent entre 1,3 et 2,7 % de la réponse ATP, lorsqu'il n'y en a plus qu'une, aucune photorégulation n'est observable excepté pour la construction I328C (OOI) rP2X2-3T où elle représente 0,8% lorsqu'elle est discernable.

Le même protocole a été réalisé lors d'une application d'ATP saturante afin d'étudier le phénomène d'optoblocking : cette fois-ci, on peut observer un effet de l'irradiation sur la réponse ATP pour toute les constructions (Figure 4.6.). Pour le récepteur monomérique et la construction contrôle I328C (III) rP2X2-3T, la diminution du courant ATP est de 25% suite à une irradiation visible, pour les constructions ayant deux cystéines, cette diminution est divisée par deux (12% en moyenne), puis diminue encore d'un facteur deux lorsqu'il n'y qu'une seule cystéine présente (5,7% en moyenne).

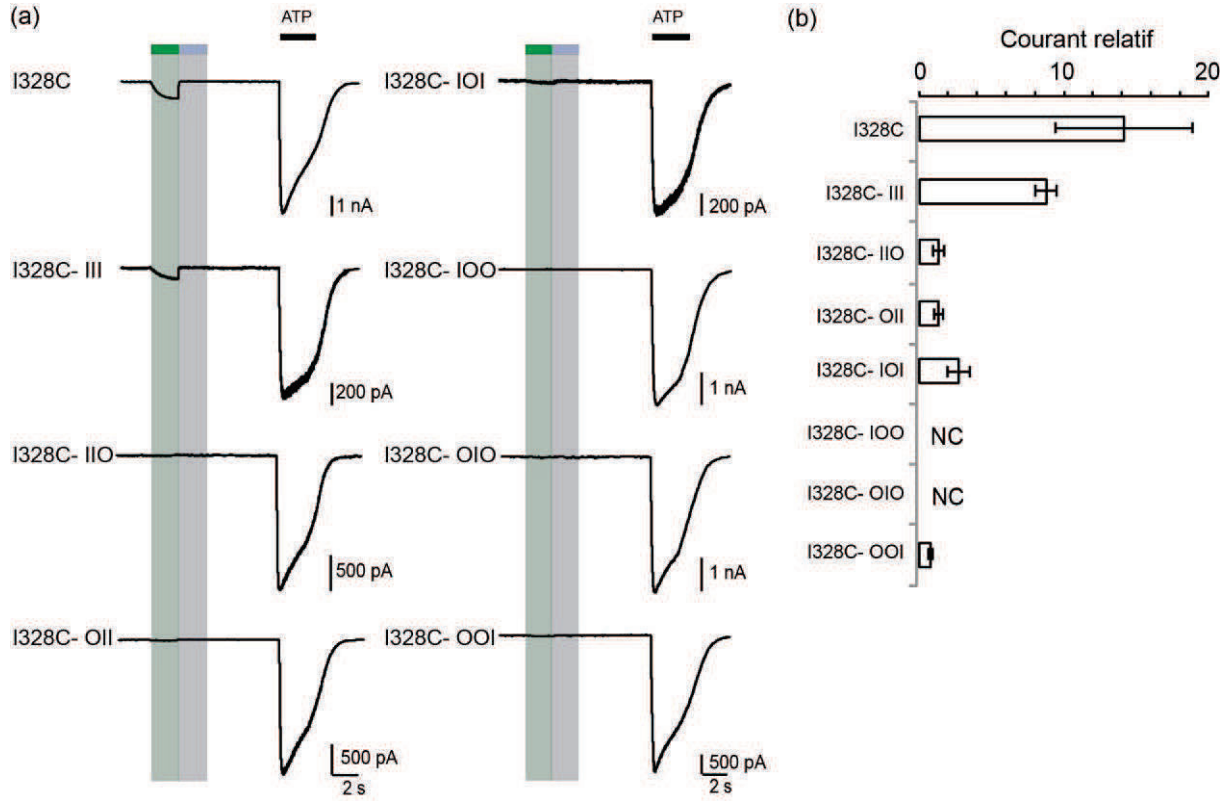


Figure 4.7 : Etude de l'optogating. (a) courants électrophysiologiques enregistrés sur des cellules HEK-293 exprimant les différentes constructions marquées par le MEA-TMA lors d'une irradiation et lors d'une application d'ATP (300µM). (b) histogramme du courant de photorégulation comparé à une réponse ATP saturante sur les différentes constructions.

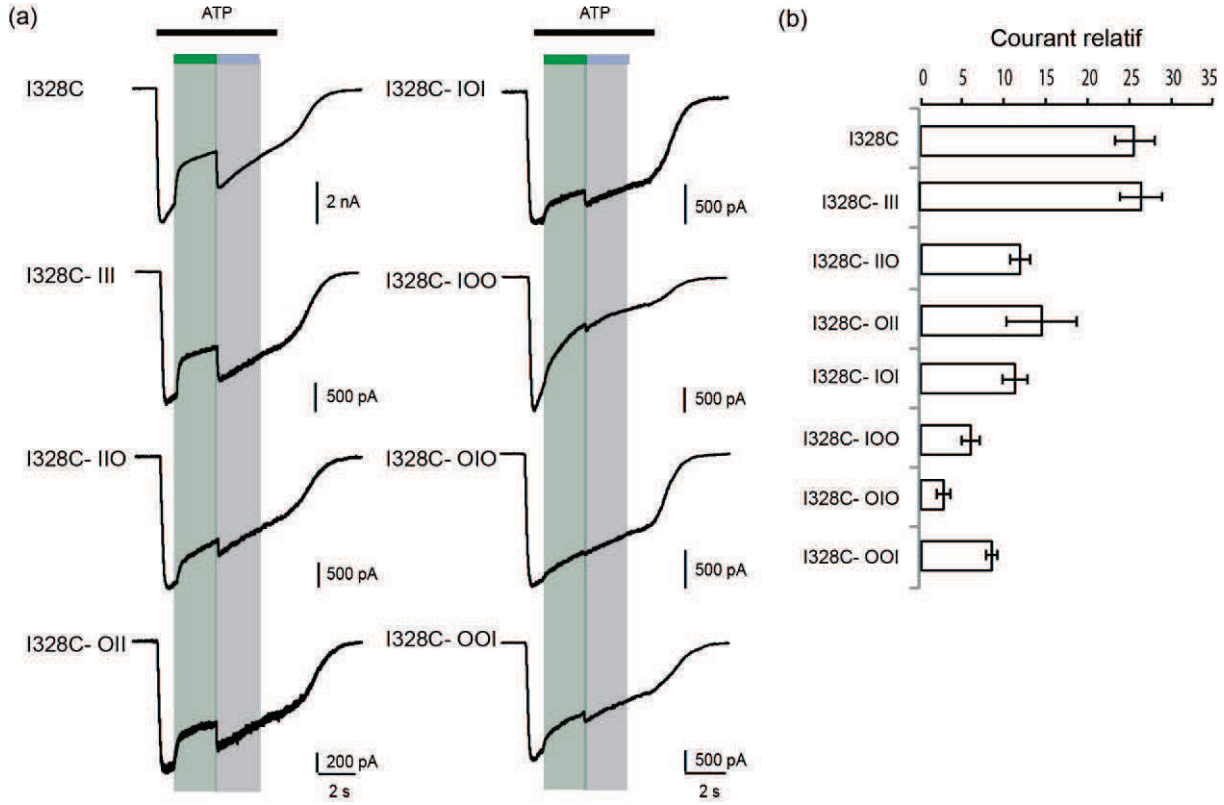


Figure 4.8 : Etude de l'optoblocking. (a) courants électrophysiologiques enregistrés sur des cellules HEK-293 exprimant les différentes constructions marquées par le MEA-TMA lors d'une irradiation concommitante à une application d'ATP (300µM). (b) histogramme de la proportion du courant ATP inhibé par une irradiation à 525nm comparé à une réponse ATP saturante sur les différentes constructions (le courant relatif est calculé selon l'équation 1- I_{vis}/I_{ATP}).

2.4. Discussion

Comme les premiers résultats obtenus lors du premier projet sur des récepteurs trimériques le suggéraient, avec à la fois un profil de *trans*-opener et de *trans*-bloqueur pour le même mutant I328C, deux mécanismes différents ont lieu lors d'une irradiation selon que l'on soit en présence d'ATP ou non. Concernant l'optogating, il apparaît que ce mécanisme nécessite le marquage par trois molécules pour être efficace car les intensités de courant de photorégulation sont très faibles voire inexistantes lorsque deux ou une cystéine sont introduites. Du fait de l'observation d'un optoblock sur ces constructions, on peut affirmer que ces résultats ne sont pas dus à un défaut de marquage, cependant, il n'est pas exclu que nous ayons deux populations qui coexistent : des récepteurs marqués et des récepteurs non (ou partiellement) marqués expliquant la différence d'intensité de photorégulation avec un récepteur monomérique. Concernant le phénomène d'optoblocking, une seule molécule de MEA-TMA suffit pour induire une diminution des courants ATP, et on observe une incrémentation de l'obstruction en fonction du nombre de molécules fixées. Il semble donc que l'isomère *trans* dans l'état ouvert du récepteur vienne positionner la charge à proximité de la voie de passage des ions, créant une répulsion électrostatique suffisante pour gêner le flux de cations. En revanche, en absence d'ATP, l'isomère *trans* viendrait modifier les interactions inter sous-unités entre les hélices TM2, déstabilisant l'état fermé. Au regard de la structure cristallographique, on peut émettre deux hypothèses concernant ce mécanisme : dans la première, l'isomère *trans* viendrait positionner la charge à l'interface entre les hélices et provoquer leur éloignement par gêne stérique, induisant l'ouverture du canal, dans la seconde hypothèse, la molécule entière peut s'insérer entre les hélices et venir occuper une des crevasse au sein de la membrane. Cette deuxième hypothèse me semble plus probable dans la mesure où ces cavités sont les sites supposés d'interaction de l'ivermectine, un modulateur allostérique positif sur P2X4. L'isomère *trans* viendrait donc stabiliser l'état ouvert d'une manière similaire. Cependant, la présence d'une charge au sein d'un environnement hydrophobe est peu favorable et la molécule est trop courte (~19Å) pour traverser entièrement la membrane. Il se peut donc que la charge soit orientée vers le pore tout en gardant le squelette azobenzène à l'interface entre les sous-unités et qu'un phénomène de répulsion des ions ait quand même lieu, masqué par la stabilisation de l'état ouvert. Ceci expliquerait la diminution de la perméabilité calcique décrite précédemment.

Ces hypothèses nécessitent cependant une modélisation du récepteur avec le MEA-TMA fixé sur le résidu I328C pour être étayées ou non, néanmoins, le seul point d'ancrage est le résidu I328C et ceci implique que la molécule peut explorer une grande quantité de « pauses » lors du docking ce qui est une limitation importante pour cette méthode. On pourrait également envisager une campagne de mutagénèse sur les résidus identifiés comme étant à l'interface entre les sous-unités dans l'état ouvert afin d'étudier l'effet sur l'optogating comme cela a déjà été fait avec l'ivermectine.

3. Développement d'une sonde moléculaire

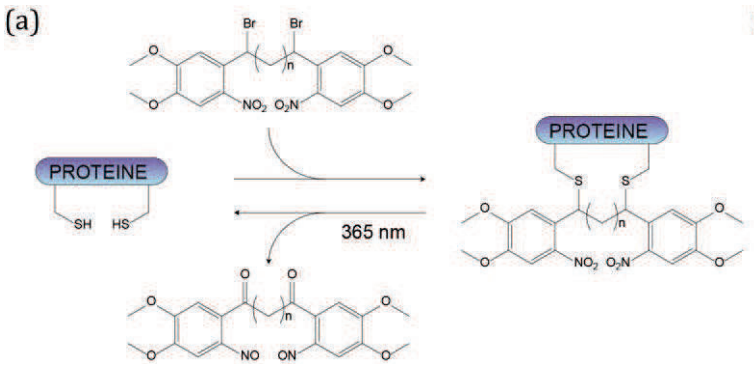
3.1. Contexte

Ce deuxième projet est le cœur de mes travaux de thèse. Lorsqu'il a débuté, nous n'avions pas encore développé la stratégie d'optogating et la structure cristallographique de l'état ouvert venait d'être publiée. Comme je l'ai décrit précédemment au cours de l'introduction, cette dernière soulève de nombreuses questions. L'absence d'intéractions au sein de la membrane, qui, à ma connaissance, n'a été montrée sur aucune autre structure de protéine membranaire, est surprenante dans la mesure où la structure quaternaire du récepteur ne serait alors stabilisée que par des intéractions situées dans l'ectodomaine extracellulaire et que les segments transmembranaires, reliés par des régions linkers flexibles, seraient contraints uniquement par l'environnement lipidique. Par ailleurs, les larges crevasses qui apparaissent entre les segments transmembranaires pourraient permettre l'entrée des lipides et l'obstruction du pore et semblent donc peu compatibles avec un état physiologique du récepteur. L'utilisation de détergents et la troncature des extrémités intracellulaires pour la cristallisation peut conduire à certains artéfacts, c'est pourquoi la structure nécessite d'être affinée par de nouvelles données expérimentales. De nombreuses stratégies ont déjà été exploitées pour prouver des rapprochement de résidus entre eux et des mouvements de domaines du récepteur notamment par l'ingénierie de ponts disulfures bloquant des conformations ou de sites de métallation prouvant la proximité de résidus, sans toutefois quantifier précisémment ce phénomène dynamique. Nous avons donc décidé de concevoir de nouveaux outils permettant de sonder les

variations de distances entre les résidus au sein de la protéine ayant lieu au cours des transitions allostériques.

3.2. Stratégie I : les crosslinkers photoclivables

Notre laboratoire étant à l'interface entre la chimie et la biologie, nous avons l'avantage de pouvoir concevoir rapidement des molécules chimiques utilisables comme outil d'exploration biologique potentiel. A mon arrivée, nous disposions d'une série de molécules crosslinkers photoclivables dont les distances entre les groupements thiol-réactifs étaient contrôlées et incrémentées, de 6 à 12 Å (Omran and Specht, 2009). Ces molécules peuvent ainsi être assimilées à des agrafes de taille précise et servir de verrou de transitions conformationnelles, de la même manière que les ponts disulfures, mais présentent l'avantage d'explorer une gamme de distances plus large. De plus, le pontage est clivable par une irradiation à 365nm (Figure 4.9). Nous espérions, d'une part, obtenir des informations en terme de distances entre les résidus afin d'améliorer la structure cristallographique déjà disponible, et d'autre part, pouvoir piéger certaines conformations du récepteur avec ces molécules, notamment des états intermédiaires d'activation, et *in fine* pouvoir les cristalliser. Deux régions d'intérêt se détachaient pour ce projet : la mâchoire du site de liaison et les segments transmembranaires. J'ai choisi de me focaliser sur la zone transmembranaire du récepteur dans la mesure où : (i) les mouvements de fermeture du site de liaison de l'ATP commençaient à être bien documentés et (ii) le domaine proche du pore ionique est celui qui semble subir les changements conformationnels les plus conséquents lors du gating et dont l'organisation est la plus discutée. Etant donné que l'objectif final était la cristallisation de l'état piégé, j'ai commencé par travailler sur le sous-type zfP2X4, seul récepteur cristallisé jusqu'à aujourd'hui.



(b)

n	Distance S-S
4	6,4
5	7,8
6	9,3
7	10,4
8	11,7

Figure 4.9 : Crosslinkers photoclivables. (a) réactions de marquage des cystéines de la protéine et de clivage par la lumière UV. (b) tableau des distances séparant les deux atomes de soufre en fonction de la taille du crosslinker.

3.3. Matériel et méthodes

Marquage des protéines de surface avec un dérivé MSTEA-Biotine

Ce marquage des protéines de surface est réalisé selon le même protocole que celui décrit précédemment excepté la première étape de marquage où le MSTEA-Biotine (0,4mM dans du PBS+ pH8,0) est appliqué en absence ou en présence d'ATP (500µM) pendant 20min. Les cellules utilisées sont des cellules HEK-293.

Marquage des protéines de surface avec les crosslinkers photoclivables

Les cellules HEK-293, transfectées la veille avec 10µg de plasmide sont incubées 30 min à 2h avec le crosslinker (50µM) dans du PBS+ froid pH8,0, lavées rapidement et incubées avec une solution quencher de NACME (10mM, PBS+ pH8,0). Suit un marquage au Sulfo-NHS-LC-Biotine (2mM, 30min) est réalisé comme décrit précédemment. Lors de la solubilisation, 50mM de iodoacétamide sont ajoutés au PBS. La membrane de nitrocellulose est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps murin anti Cmyc (Invitrogen) dilué au 1/2500ème dans du TBPS, puis pendant 2h à température ambiante avec un anticorps anti-murin conjugué à une peroxidase (dilution 1/10000; GE Healthcare) et lavée trois fois avec du TPBS. Les bandes de protéines sont révélées avec un kit de détection ECL (GE Healthcare).

3.4. Résultats

En m'appuyant sur les deux structures cristallographiques disponibles, j'ai identifié une zone compatible avec notre stratégie où les résidus s'éloignent suffisamment (d'une dizaine d'angströms) entre les deux états du récepteur (fermé et ouvert) et dont les distances entre les résidus dans l'état fermé sont inférieures à 18 angströms. Cette limite a été définie afin de sélectionner des résidus compatibles avec un marquage par nos molécules sans être trop restrictif si l'on envisage que la structure cristallographique est peut être trop dilatée (Table 4.2). Dans la partie extracellulaire du canal, 7 couples de résidus situés à la fois sur TM1 et sur TM2 répondent à ces critères. Cependant, la présence d'une cystéine endogène en position 51 sur le récepteur zfP2X4 posait problème puisqu'elle pouvait potentiellement interférer avec notre marquage, elle a donc été mutée en un résidu alanine puis sérine mais la fonctionnalité de ces mutants, évaluée par électrophysiologie patch-clamp, était insuffisante (~50pA pour une concentration saturante d'ATP). La suite des travaux a donc été réalisée sur le récepteur rP2X2-3T qui ne possède pas cette cystéine endogène. Les 7 doubles mutants rP2X2 homologues à ceux identifiés sur zfP2X4 sont fonctionnels et l'ajout de DTT ou de TCEP, des agents réducteurs, n'a pas d'effet sur les courants ATP, un argument en faveur d'une absence de pontage spontané entre les résidus cystéines introduits. L'accessibilité des résidus a été évaluée par marquage des protéines de surface avec un dérivé MTSEA-Biotine en présence et en absence d'ATP, puis migration en gel SDS-PAGE et western-blot. Tous les résidus sélectionnés sont accessibles en présence d'ATP, ce qui a orienté notre choix de conditions de marquage. Lors d'un premier criblage par biochimie de ces mutants avec 5 molécules photoclivables aucune touche potentielle n'a été identifiée.

Résidus		DISTANCES	
		Etat fermé	Etat ouvert
N333	S326	13,8 ± 0,2	24,0 ± 0,7
V51	S326	13,7 ± 0,2	19,6 ± 0,7
Q52	S326	10,3 ± 0,1	18,4 ± 0,3
D57	S326	18,3 ± 0,1	29,0 ± 0,2
S58	S326	17,9 ± 0,3	24,5 ± 0,3
Y47	S326	11,5 ± 0,0	17,8 ± 1,1
V48	S326	10,7 ± 0,2	20,0 ± 0,5

Table 4.2 : Paires de résidus ciblées pour le criblage des composés photoclivables. Les distances indiquées sont mesurée entre les C_β des résidus sélectionnés pour le criblage sur un modèle par homologie rP2X2.

3.5. Discussion

Ces tests préliminaires devaient nous permettre d'identifier des paires de résidus dont l'éloignement au cours du gating était important pour la fonctionnalité du récepteur et d'obtenir un jeu de distances précis afin d'affiner la structure cristallographique dans la zone transmembranaire et ainsi réduire le criblage de la deuxième stratégie envisagée. Cependant, après l'absence de pontage observé sur gels lors du premier criblage, j'ai décidé de mettre de côté cette partie du projet car il demandait une optimisation de toutes les conditions de marquage (temps d'incubation, concentrations, tampons, quenchers à utiliser…) coûteuse en temps et dont l'intérêt pour la suite de mon projet était limité.

3.6. Stratégie II : les agrafes photoisomérisables

Les différentes stratégies d'études fonctionnelles du phénomène de gating développées jusqu'à présent ne s'inscrivent pas dans une exploration dynamique dans la mesure où elles piègent des états au cours de l'ouverture et ne sont finalement que des images instantanées d'un état conformationnel. Comme je l'ai déjà décrit au chapitre 3 de l'introduction, des crosslinkers azobenzènes ont été développés ces dernières années pour réguler l'activité de peptides en provoquant des changements de conformations suffisants pour altérer leur fonction. Nous avons décidé d'étendre le principe de cette technique à une protéine entière. Néanmoins, nous ne voulons pas déstructurer la protéine, mais plutôt mimer les mouvements relatifs entre les sous-unités du récepteur P2X ayant lieu lors de l'ouverture induite par l'ATP (Figure 4.10). Pour cela, un premier crosslinker photoisomérisable a été synthétisé par le doctorant Damien Lemoine, que l'on nommera MAM (maléimide-azobenzène-maléimide) par la suite. Cette molécule permet d'explorer des variations de distance d'une dizaine d'angströms, avec un composé court *cis* dont la distance moyenne entre les maléimides est de 13Å et un isomère long *trans*, thermodynamiquement stable de 21Å. J'ai, dans un premier temps, cherché à démontrer la faisabilité et la pertinence de notre approche sur une zone relativement bien connue du récepteur, le domaine transmembranaire extracellulaire qui subit une expansion importante lors du gating, afin d'explorer par la suite d'autres mouvements peu documentés. De nombreuses

études ayant mis en évidence le rôle crucial des parties intracellulaires pour les phénomènes de gating, désensibilisation et dilatation du canal, nous nous sommes alors focalisés sur cette région.

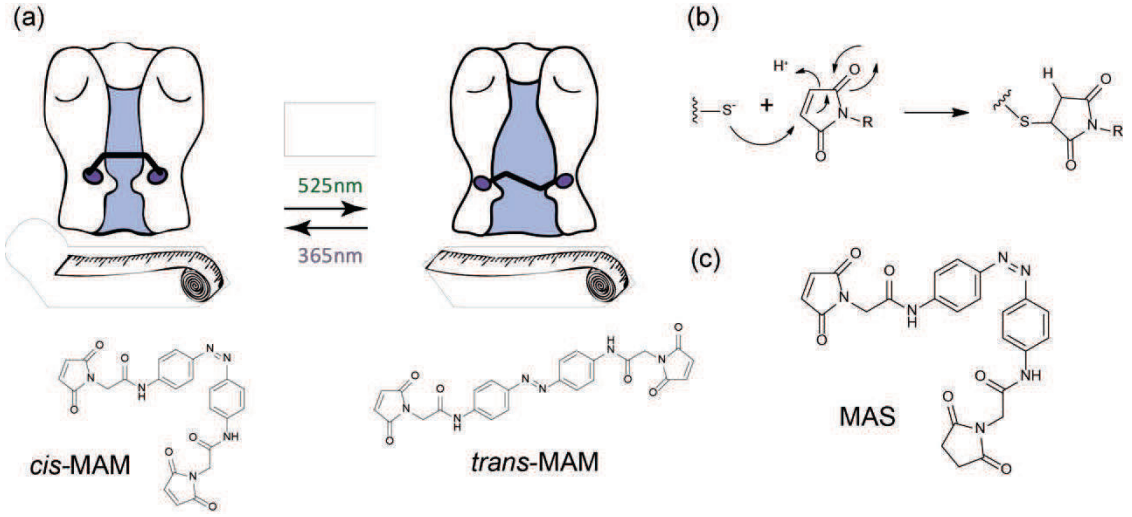


Figure 4.10 : Principe de la stratégie des sondes moléculaires. (a) Représentation schématique du principe de la stratégie et structures chimiques des isomères *cis* et *trans* du MAM. Les sphères violettes repésentent les cystéines introduites par mutagénèse dirigée sur le récepteur. (b) Réaction d'addition de Michael de la fonction thiol portée par la cystéine et du maléimide. (c) Structure chimique du MAS, molécule à un seul point d'ancrage.

3.7. Matériel et Méthodes

Marquage des cellules pour l'électrophysiologie (MAM, MAS)

Le MAM et le MAS sont dilués dans des solutions stock de DMSO à 5mM et 1,5mM respectivement. Les solutions d'incubation sont réalisées extemporanément dans du NES. Elles contiennent 3µM d'ATP, 1% de DMSO, 1-15µM de MAS ou de MAM (pour les criblages horizontal intracellulaire et vertical transmembranaire) ou 50µM de MAM pour le marquage horizontal extracellulaire. Les temps d'incubation sont de 20min pour les solutions de MAM et 40 minutes pour les solutions de MAS.

Marquage des protéines de surface au MAM

Le marquage par le MAM des protéines de surface est réalisé sur des cellules TSA-201 transfectées avec 10µg de plasmide la veille. Les cellules sont incubées 20min avec 30µM de MAM en présence de 3µM d'ATP dans du PBS+ froid à pH7,0 contenant 154 mM NaCl, 2,68 mM KCl, 4,2mM Na2HPO$_4$, 1,47 mM KH$_2$PO$_4$, 1 mM MgCl$_2$ et 0,4 mM CaCl$_2$. Elles sont rapidement lavées au PBS+ et incubées au sulfo-NHS-SS-Biotine dans du PBS+ pH8,0 comme

décrit précédemment. La membrane de nitrocellulose est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps murin anti Cmyc (Invitrogen) dilué au 1/2500ème dans du TBPS, puis pendant 2h à température ambiante avec un anticorps anti-murin conjugué à une peroxidase (dilution 1/10000; GE Healthcare) et lavée trois fois avec du TPBS.

Enregistrement en canal unitaire

Les enregistrements électrophysiologiques en canal unitaire sont réalisés sur des cellules HEK-293 24h après transfection. Les pipettes de verre borosilicaté (Harvard Apparatus) sont étirées, enveloppées de Sylgrad 184 (Dow Corning Co.), et polies, elles ont une résistance de 6-20MΩ. La solution intrapipette contient 147 mM NaF, 10 mM Hepes, et 10 mM EGTA, pH 7.3.Le potentiel est imposé à -120mV. La solution externe standard est composée de 147 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10mM Hepes, et 13 mM glucose, pH 7.3. Les données sont échantillonnées à 4–10 kHz, et un filtre à 2.9 kHz est appliqué. Lors de l'analyse, les données sont de nouveau filtrées pour obtenir au final une fréquence cutoff de 1–2 kHz. Les événements d'ouverture sont détectés en utilisant le logiciel TAC (Bruxton Co.) et les conductances sont mesurées après analyse gaussienne des histogrammes de distribution d'amplitude.

Puissance des LEDs

Les intensités d'irradiation en sortie de l'objectif sont de 8,1 et 4,1mW/mm² pour les longueurs d'onde 365 et 525nm respectivement.

Perméabilité

Les mesures des perméabilités sont réalisées comme décrit précédemment. Les rampes (165ms,-120mV +80mV) sont appliquées 300ms après le début de l'irradiation afin de correspondre au pic de courant observé sur le mutant I328C activé par la lumière visible. La concentration en glucose de toutes les solutions est de 10mM.

3.8. Résultats

Preuve du principe

- **Caractéristiques du MAM**

La molécule, dont la synthèse a été optimisée par une des stagiaires du laboratoire Laurie Peverini, est un amidoazobenzène symétrique qui s'isomérise dans le DMSO sous une irradiation à 365nm d'une conformation *trans* à une conformation *cis*. Le retour à l'isomère

thermodynamiquement stable *trans* s'effectue très lentement par relaxation thermique (τ = 388 ± 28min) ou rapidement lors d'une irradiation dans le domaine du visible (525nm). En solution aqueuse avec un faible pourcentage de DMSO, ce composé à un comportement différent : on observe un décalage du pic d'absorption maximal à 315nm (et non plus à 375nm) et le phénomène de photorégulation est partiel (Figure 4.11). Ce comportement a soulevé de nombreuses interrogations et de nombreux tests ont été réalisés. Il semblerait que diminuer la concentration en MAM diminue ce phénomène mais l'absorbance de la solution est alors trop faible pour être catégorique sur ce point, on retrouve également un spectre classique d'amidoazobenzène lorsque le pourcentage de DMSO est supérieur à 20%. Des mesures au nanosizer ont été réalisées sur une solution à 1% de DMSO et 50µM de MAM montrant des particules d'une taille d'environ 400 à 500nm, et une explication avancée à ce phénomène est une possible agrégation du MAM en solution aqueuse. Néanmoins, pour notre marquage, une très faible concentration suffit (0,5 à 15µM), et une fois fixé dans la protéine, l'environnement est suffisamment hydrophobe pour qu'il retrouve

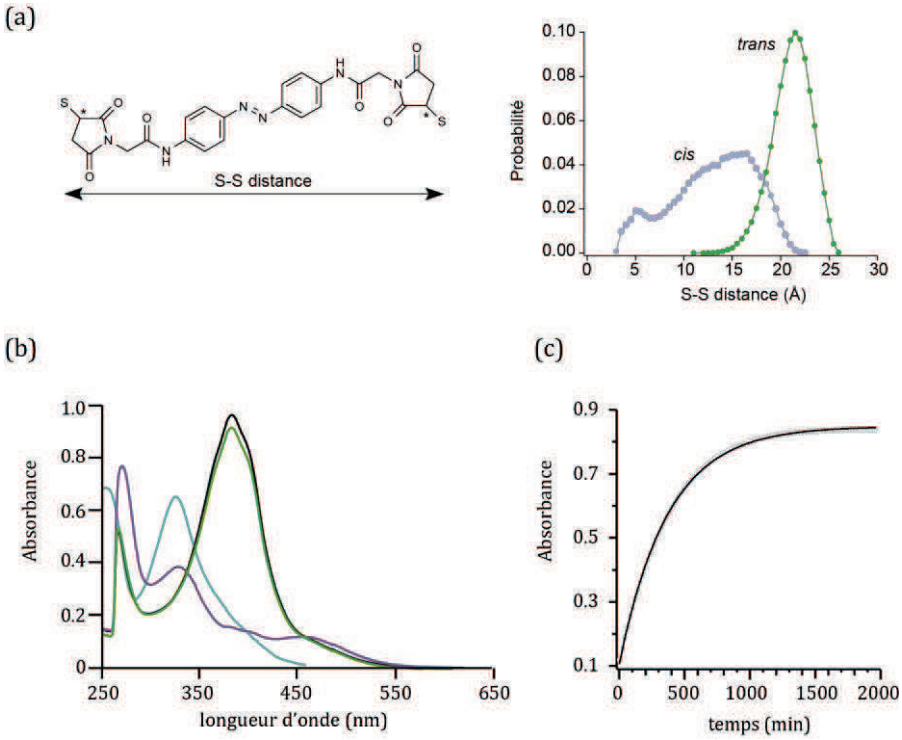


Figure 4.11 : Caractérisation du MAM (a) Structure chimique du MAM ayant réagit avec deux fonctions thiols et distribution des distances S-S sur les deux isomères. Les astérisques représentent les centres stéréochimiques (b) Spectres d'absorption du MAM (i) à 30µM enregistrés dans le DMSO à l'obscurité (trace noire) après 5min d'irradiation à 365nm (trace violette) et après 5min d'irration à 525nm (trace verte), (ii) à 50µM enregistré dans une solution de NES contenant 1% de DMSO à l'obscurité (trace bleue). (c) relaxation thermique enregistrée à 375nm de l'isomère *cis* dans du DMSO.

un comportement classique d'isomérisation. Des simulations de dynamique moléculaire du MAM réalisées par nos collaborateurs à l'ISIS, ont permis de connaître les distances explorées en solution par les deux isomères : l'isomère *trans* peut ponter des résidus éloignés en moyenne de 21,4 Å ± 2,0 avec une distance maximum de 26Å ; l'isomère *cis* peut, quant à lui, ponter des résidus éloignés de 13,3 Å ± 4,3 environ mais dans une gamme très large, allant de 3 à 21Å avec une probabilité moins bien définie que pour l'isomère *trans*. Il y a donc une zone de recouvrement des distances entre les deux isomères mais qui représente une faible probabilité.

- **Criblage horizontal extracellulaire**

Au début de ce projet, nous n'avions aucune donnée nous permettant de connaître l'efficacité d'une telle stratégie et nous ne savions pas si l'isomérisation d'une seule molécule réussirait à induire un changement conformationnel suffisant pour ouvrir le récepteur ni le nombre d'interfaces à cibler. J'ai donc conçu deux groupes de mutants : un premier groupe de simples mutants où un seul résidu est muté en cystéine permettant l'accroche d'un seul crosslinker et un deuxième groupe de doubles mutants où trois molécules peuvent potentiellement se fixer. Guidée par un modèle de rP2X2 construit par homologie avec les structures cristallographiques de zfP2X4, j'ai sélectionné des résidus sur TM1 et sur TM2 dont l'éloignement était compatible avec les distances explorées par le MAM dans ses conformations *cis* ou *trans*. Ainsi, j'ai muté successivement 10 résidus pour le premier groupe et réalisé 15 combinaisons de double mutants pour le deuxième groupe (Table 4.3). Tous sont fonctionnels et ont une affinité apparente pour l'ATP peu modifiée par rapport à rP2X2-3T. Après un premier criblage, 8 mutants du premier groupe et 12 du second marqués par notre molécule (50µM, 20min d'incubation, NES + 3µM d'ATP, 1% de DMSO) photorégulaient l'activité du récepteur (sauf Q52C, P329C, Q52C/S326C, V51C/S326C et D57C/S326C). Excepté pour les mutants N333C et V51C/I332C, l'irradiation à 525nm induisait des courants entrants plus importants que l'irradiation UV. Devant le nombre élevé de touches positives, j'ai testé en contrôle l'effet d'une molécule isostère du MAM mais qui ne pouvait réagir qu'avec une seule cystéine, le MAS (maléimide azobenzène succinimide). Je me suis concentrée sur le premier groupe de simples mutants dans la mesure où le marquage par une seule molécule semblait suffire. Après marquage par le MAS, les profils de photorégulation obtenus sur les mutants précédemment testés exceptés trois (Y47C, D57C

et I328C) étaient similaires à ceux observés après marquage au MAM, ce qui suggère que les profils observés sont dus au pontage d'une seule cystéine par le MAM et que la photorégulation observée est due au phénomène d'optogating décrit dans le projet précédent (Figure 4.12). Pour le mutant D57C, suite au marquage par le MAS aucun courant photoinduit n'est observable. En revanche pour les deux résidus Y47C et I328C, les courants photoinduits par le MAM et le MAS diffèrent en terme (i) de cinétique d'activation, (ii) d'amplitude et (iii) de stabilité après arrêt de l'irradiation (Figure 4.13). Pour une puissance d'irradiation identique, l'activation maximale est obtenue environ 2 fois plus rapidement lors

	Résidus		DISTANCES	
			Etat fermé	Etat ouvert
SERIE 1	Y47	Y47	26,6 ± 0,1	28,3 ± 0,5
	V48	V48	18,6 ± 0,2	22,8 ± 0,4
	Q52	Q52	20,9 ± 0,1	24,0 ± 0,2
	D57	D57	15,1 ± 0,0	26,6 ± 0,3
	S58	S58	13,3 ± 0,1	20,0 ± 0,2
	S326	S326	19,9 ± 0,1	31,0 ± 0,2
	I328	I328	16,1 ± 0,1	27,6 ± 0,4
	P329	P329	12 ± 0,2	23,4 ± 0,3
	I332	I332	7,2 ± 0,2	19,4 ± 0,2
	N333	N333	11,3 ± 0,3	20,8 ± 0,2
SERIE 2	Y47	S326	11,5 ± 0,04	17,8 ± 1,1
	V48	S326	10,7 ± 0,18	20,0 ± 0,5
	V51	S326	13,7 ± 0,22	19,6 ± 0,7
	Q52	S326	10,3 ± 0,07	18,4 ± 0,3
	D57	S326	18,3 ± 0,08	29,0 ± 0,2
	S58	S326	17,9 ± 0,32	24,5 ± 0,3
	I332	S326	16,5 ± 0,22	27,1 ± 0,4
	N333	S326	13,8 ± 0,19	24,0 ± 0,7
	Y47	I332	12,2 ± 0,22	13,1 ± 0,5
	V48	I332	8,3 ± 0,16	13,7 ± 0,4
	V51	I332	15,9 ± 0,18	16,7 ± 0,4
	Q52	I332	11,0 ± 0,08	14,4 ± 0,3
	D57	I332	15,8 ± 0,2	24,5 ± 0,3
	S58	I332	17,8 ± 0,19	21,5 ± 0,2
	N333	I332	6,1 ± 0,37	16,8 ± 0,4

Table 4.3 : Distances entre les C_β des résidus choisis pour les criblages.

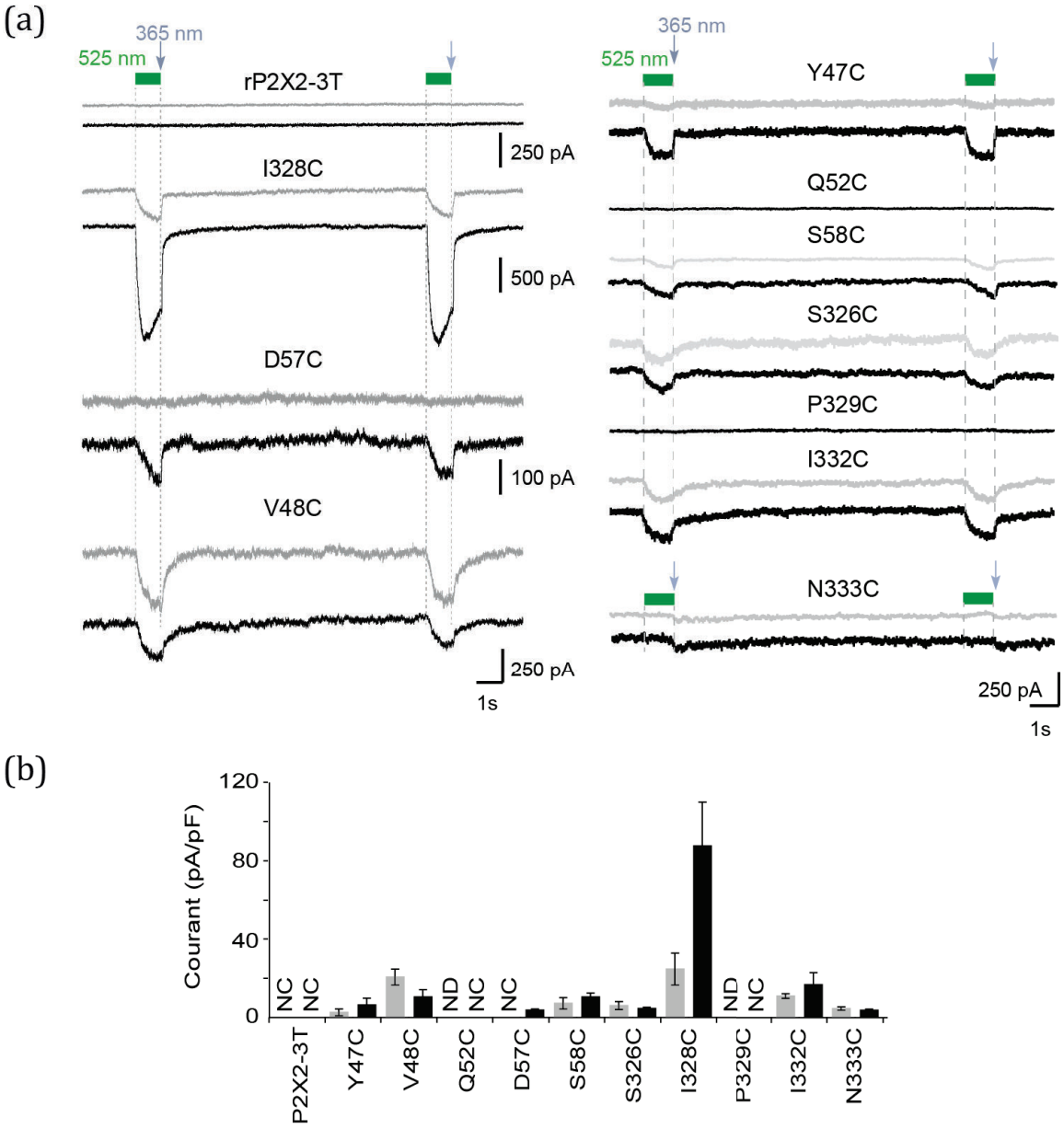


Figure 4.12 : Criblage horizontal extracellulaire de la série 1. (a) traces électrophysiologiques enregistrées lors d'irradiations à 525 et 365nm en absence d'ATP sur des cellules exprimant les différentes constructions après marquage par le MAM (en noir) ou le MAS (en gris). (b) histogramme des densités de courant lors d'une irradiation à 525nm (excepté pour N333C où l'irradiation activatrice est à 365nm) suite à un marquage par le MAM (noir) ou le MAS (gris). (n=4-5 cellules ; moyenne ± sem) NC = no current, ND = non mesuré.

du marquage par le MAM (τ (I328C) = 0,131 ± 0,009s et τ (Y47C) = 0,203 ± 0,031s) que lors du marquage par le MAS (τ (I328C) = 0,248 ± 0,027s et τ (Y47C) = 0,463 ± 0,087s). Par ailleurs, la stabilité des courants pendant et après l'irradiation est caractéristique pour chaque molécule : si le marquage par le MAS provoque des courants bistables (ΔMAS (I328C) = 71 ± 5% et ΔMAS (Y47C) = 73 ± 1%) comme ceux précédemment observés avec le MEA-

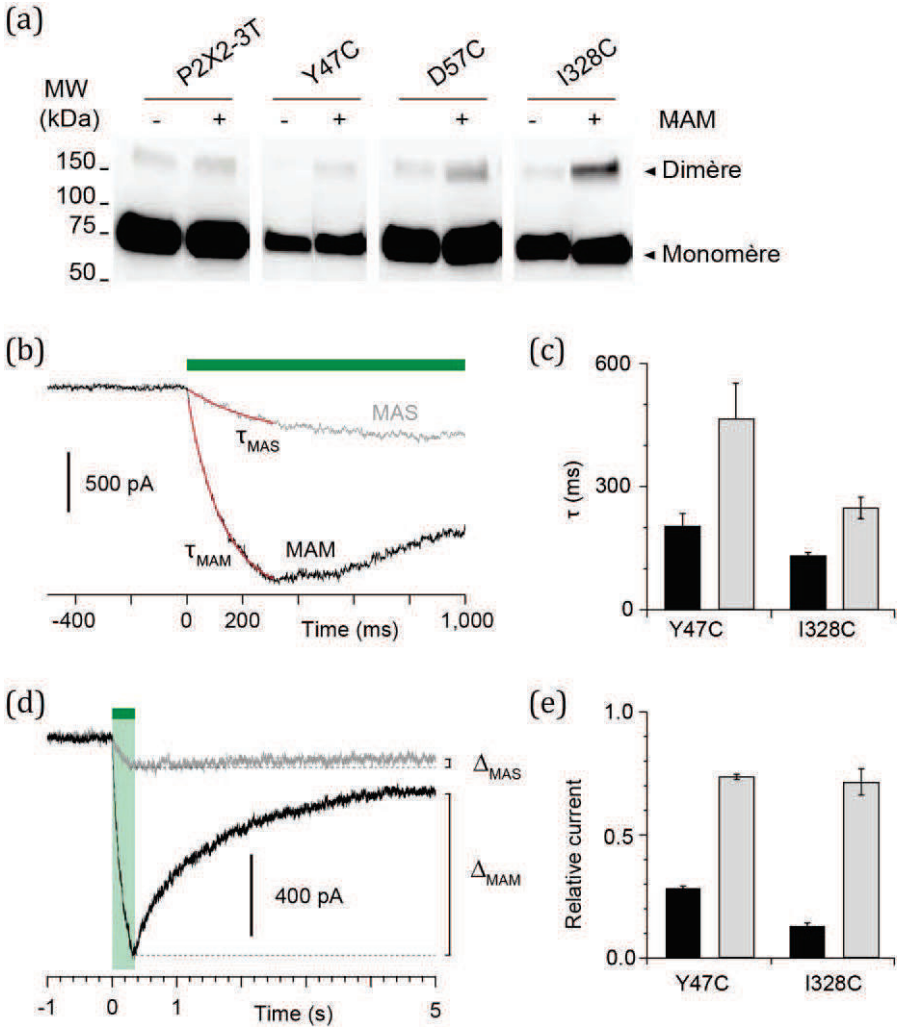


Figure 4.13 : Spécificité du double pontage par le MAM et caractérisation des courants photoinduits. (a) Western-blot suite à des gels SDS-PAGE réalisés en conditions réductrices des récepteurs exprimés en surface et marqués (+) ou non (-) par le MAM. (b) Courants photoinduits enregistrés en configuration cellule entière sur des cellules HEK exprimant le mutant I328C marqué par le MAM (trace noire) ou le MAS (trace grise). (c) histogramme des constantes de temps d'activation des récepteurs Y47C et I328C calculées lors d'une irradiation à 525nm après une incubation par le MAM (noir) ou le MAS (gris) (n=4-8 cellules ; moyenne ± sem) (c) traces électrophysiologiques du courant photoinduit par une courte irradiation visible sur le récepteur I328C après marquage par le MAM (noire) ou le MAS (grise). ΔMAM et ΔMAS sont définis par le ratio des courants mesurés 5s après l'irradiation à 525nm et le courant maximal photoinduit. (e) histogramme de la stabilité des courants des récepteurs Y47C et I328C marqués par le MAM (noir) ou le MAS (gris). (n=4-6 cellules ; moyenne ± sem).

TMA, le marquage par le MAM quant à lui, produit une diminution progressive des courants jusqu'à un plateau différent de l'état fermé du récepteur (ΔMAM (I328C) = 13± 8% et ΔMAM (Y47C) = 28 ± 1%) et dont la cinétique varie en fonction de l'arrêt ou non de l'irradiation. Pour confirmer la spécificité du double marquage sur ces trois derniers mutants cystéines, des gels SDS-PAGE ont été réalisés en conditions réductrices : après marquage par le MAM on observe la formation de dimère, preuve d'un pontage entre deux sous-unités permis par notre molécule (Figure 4.13).

L'isomère *trans* étant thermodynamiquement stable et le marquage se faisant en absence d'irradiation, un pulse d'UV est systématiquement appliqué sur les cellules avant les enregistrements pour basculer toutes les molécules dans un état *cis*. Il faut noter en outre, que lorsque le temps d'irradiation à 365nm est prolongé (>80ms), on observe une ouverture du récepteur qui représente environ 20% de la réponse maximale induite par l'irradiation visible et le courant est stable, signe qu'une proportion non négligeable de molécules est dans une configuration *trans* du fait du recouvrement des spectres d'absorption (Figure 4.14). Cette observation est cohérente avec l'existence d'un état photostationnaire du MAM. Le mutant I328C présentant le profil le plus robuste, nous avons continué notre étude sur celui-ci.

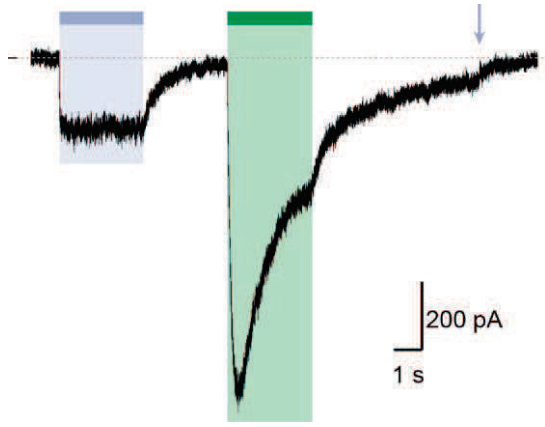


Figure 4.14 : Profil de photorégulation du mutant I328C rP2X2-3T. Courant électrophysiologique induit par des irradiations à 365nm (violet) et 525nm (vert) enregistré sur des cellules HEK exprimant le mutant I328C et marquées par le MAM préalablement irradiées par un bref pulse d'UV.

- **Caractérisation biophysique**

Nous avons dans un premier temps vérifié l'efficacité de notre marquage en testant différents temps d'incubation. Après 20 minutes d'incubation avec le MAM en présence de 3µM d'ATP, on obtient des courants de photorégulation qui représentent 31 ± 4% d'un courant ATP à concentration saturante, après 40 minutes (temps maximum permis par nos conditions d'incubation), le courant photoinduit représente 60 ± 5%. Bien que le marquage

ne soit pas total à 20 minutes, nous avons conservé ce protocole car il était le meilleur compromis entre un marquage suffisamment efficace pour produire des courants confortables pour les différentes études et une action la moins délétère possible pour les cellules.

Afin de tester la pertinence physiologique de l'activation photoinduite sur le mutant I328C, les propriétés biophysiques du récepteur marqué ont été explorées. En terme de cinétique tout d'abord, le courant maximal photoinduit est obtenu à 350ms environ lors d'une irradiation visible (τ = 0,13s), cette cinétique d'activation est proche de celle induite par l'ATP (τ =0,128 ± 0,011s) (Trujillo et al., 2006) et plus rapide que lors de l'optogating. En terme de perméabilité ionique, ce canal reste cationique avec une légère perméabilité au chlore (P_{Cl}/P_{Na} = 0,09 ± 0,03) qui n'est pas différente de celle observée sur un récepteur sauvage (P_{Cl}/P_{Na} = 0,10 ± 0,14). La perméabilité calcique est, quand à elle, légèrement diminuée d'un facteur 1,5 environ (P_{Ca}/P_{Na} = 1,30 ± 0,04). Aucune perméabilité au NMDG n'est détectée, suggérant que l'état piégé par le *trans*-MAM est un état ouvert non dilaté. Nous nous sommes alors intéressés aux propriétés accessibles à l'échelle d'un canal photorégulé. Sur le background que nous utilisons pour introduire les mutations (rP2X2-3T) la conductance unitaire est légèrement plus élevée (32,2 ± 0,7pS) que celle d'un récepteur sauvage rP2X2 (Cao et al., 2009; Jiang et al., 2011), ce qui nous a permis de détecter et de mesurer un état intermédiaire de sous-conductance (15,0 ± 1,3pS). Les patchs obtenus sur le mutant I328C marqué par le MAM sont bruités du fait d'un important phénomène de flickering masquant les événements d'ouverture. Conformément à ce qui avait été observé en configuration cellule entière, on observe une diminution de l'activité au cours de l'irradiation. L'analyse systématique des événements d'ouverture a, malgré tout, permis d'estimer une conductance unitaire (20,4 ± 1,4pS) diminuée de 35% environ par rapport à celle du contrôle (Figure 4.15). Ces résultats montrent que notre outil est capable d'induire l'expansion de la partie transmembranaire extracellulaire en accord avec les prédictions faites suite à la résolution des les structures cristallographiques.

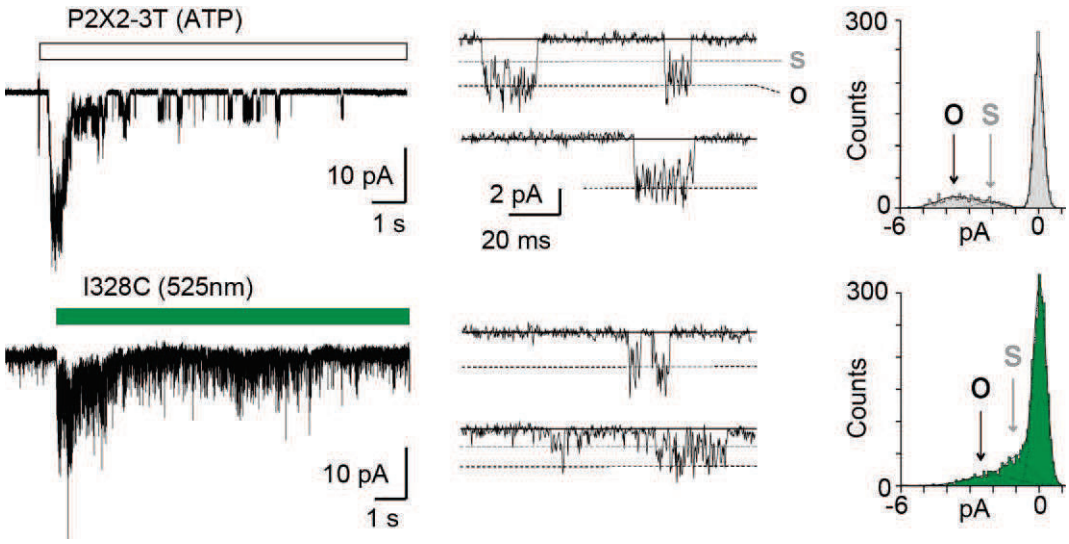


Figure 4.15 : Caractérisation unitaire du récepteur I328C photorégulé par le MAM. Enregistrements électrophysiologiques en canal unique en configuration outside-out à -120mV du récepteur rP2X2-3T lors d'une application d'ATP (10µM) (en haut) et du récepteru I328C marqué par le MAM et activé par une irradiation à 525nm (en bas). Les deux états de conductance sont désignés par les lettres O (ouvert) et S (sous-conductant) et reportés sur les enregistrements par des lignes pointillées noire (O) et grise (S). Les histogrammes résultent de la somme de trois gaussiennes.

Nous avons également exploré l'impact de l'ouverture photoinduite sur le site de liaison de l'ATP. Malgré la potentiation du courant ATP lors d'une irradiation courte à 525nm, nous n'avons pas observé de variation d'affinité apparente pour l'ATP en absence (3,8 ± 0,5µM) et lors d'une irradiation à 525nm (3,3 ± 0,4µM) (Figure 4.16). De même, l'application d'un inhibiteur compétitif, le TNP-ATP (10µM), lors d'une irradiation visible n'induit pas de diminution des courants et la présence de zinc (20µM), un potentiateur allostérique, pas de potentiation. Nous avons alors introduit la mutation K308A qui diminue fortement le gating du récepteur lors d'une application d'ATP (Cao et al., 2007), sur le mutant photorégulé. Nous observons alors une inhibition des courants photoinduits (Figure 4.16). Néanmoins, le marquage par le MAM, pour être efficace, s'effectue en présence d'ATP (3µM), nous ne pouvons donc exclure la possibilité d'un moindre marquage du à une difficulté d'accès de notre molécule sur ce mutant pour expliquer ces faibles courants. Sur ce mutant I328C, il semble qu'il n'y ait pas de répercussion significative de l'ouverture du canal induite par l'isomérisation sur le site de liaison de l'ATP.

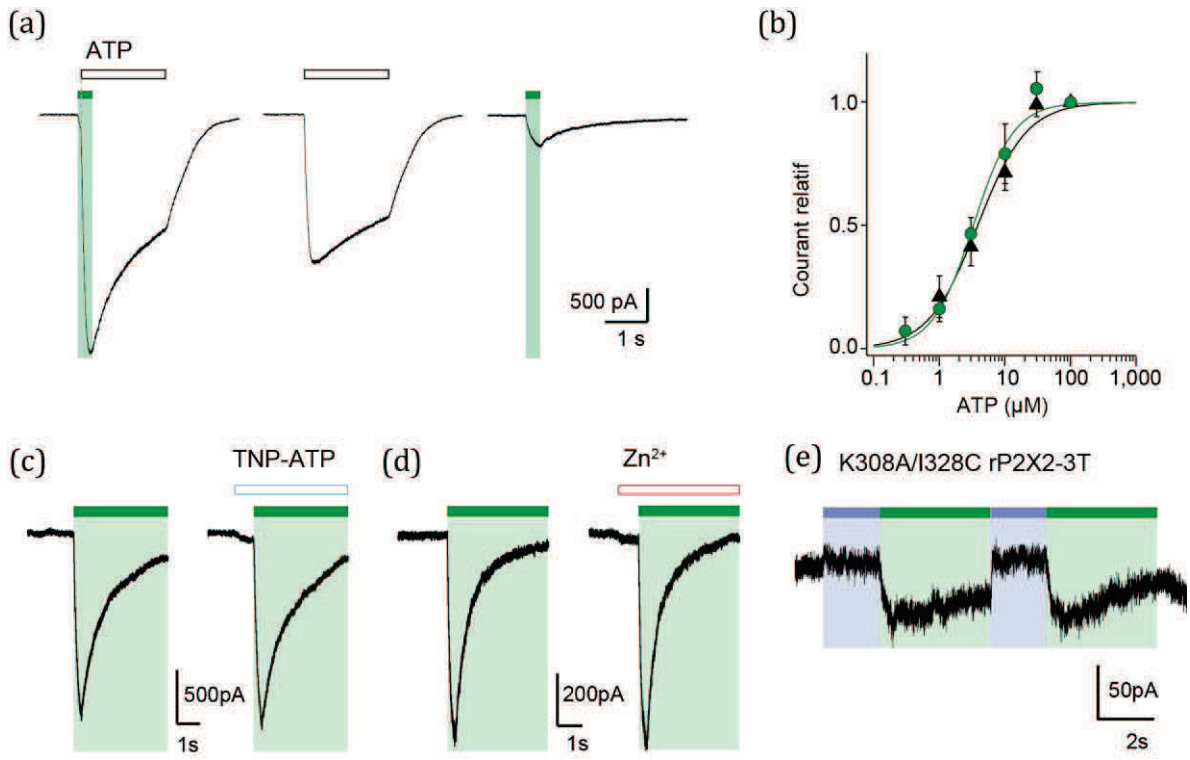


Figure 4.16 : Exploration des répercussions de l'ouverture photoinduite sur le site de liaison de l'ATP et sur le gating du mutant I328C rP2X2-3T. (a) Courants électrophysiologiques enregistrés sur des cellules HEK exprimant le mutant I328C et marquées par le MAM lors d'une irradiation à525nm conjointe à l'application d'ATP à une concentration saturante (100µM) (à gauche), lors d'une irradiation courte à 525nm (à droite) et lors d'une application seule d'ATP (au milieu). (b) Courbes dose-réponse à l'ATP à 525nm (cercles verts) et dans l'obscurité suite à une irradiation à 365nm (triangles noirs). Les courants sont normalisés par rapport à la réponse à 100µM d'ATP. (c) Effet d'un antagoniste (TNP-ATP 10µM) et (d) d'un potentiateur allostérique (Zinc 20µM) sur les courants photoinduits à 525nm. A gauche les traces électrophysiologiques obtenues en absence du composé testé. (e) Effet de l'introduction de la mutation K308A sur le mutant I328C marqué par le MAM sur les courants de photorégulation.

Exploration d'autres mouvements

- **Criblage horizontal intracellulaire**

Les structures cristallographiques et surtout l'ingénierie de sites de métallation, prédisent un rapprochement des hélices dans leur partie intracellulaire, nous avons donc testé notre molécule sur ces domaines en supposant, cette fois-ci, que l'isomère *cis* permettrait l'ouverture du récepteur. Tous les résidus situés entre V343 et W350 (rP2X2) ont été systématiquement mutés en cystéine sans tenir compte des distances prédites par les structures cristallographiques. Le criblage des 7 mutants fonctionnels (D349C ne l'est pas) après marquage au MAM n'a pas identifié de mutant photorégulable et aucune évidence de marquage efficace n'est fournie par les gels SDS-PAGE (Figure 4.17).

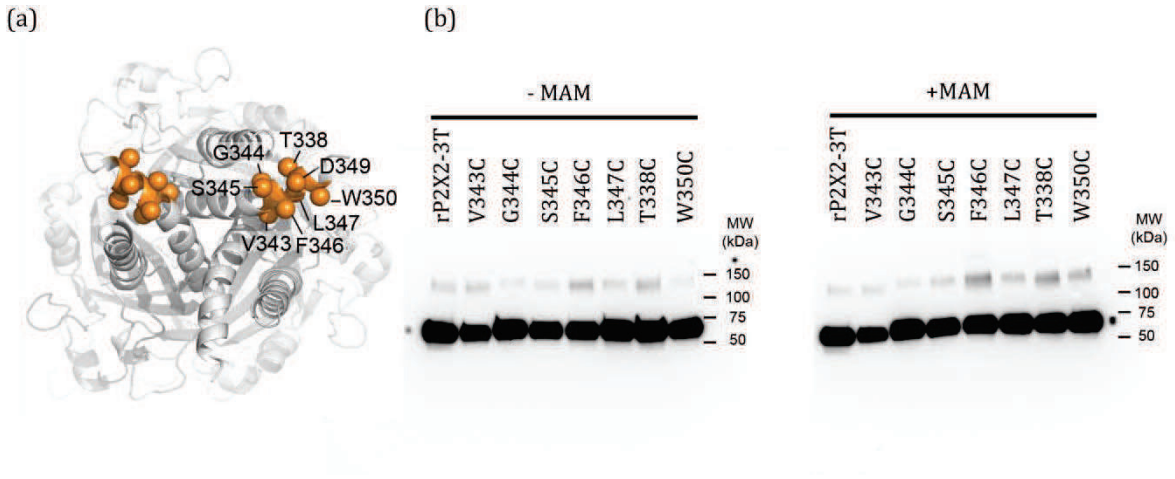


Figure 4.17 : Criblage horizontal de la partie intracellulaire. (a) Cartographie des résidus mutés en cystéine pour le criblage par le MAM, vue de la partie intracellulaire. (b) Gels SDS-PAGE des protéines de surface après marquage par le MAM.

- **Criblage vertical**

Nous avons alors choisi d'explorer, avec notre outil, de nouveaux mouvements en particulier le mouvement relatif de la zone transmembranaire extracellulaire avec la partie intracellulaire du fait de son importance dans les phénomènes de gating, de désensibilisation et de dilatation. Le résidu I328C est gardé comme point d'ancrage extracellulaire et les résidus intracellulaires sont mutés successivement pour produire 7 doubles mutants cystéines. Marqués par le MAM, tous photorégulent du fait de la présence du I328C, mais deux mutants (I328C/S345C et I328C/F346C) présentent un profil de photorégulation inversé : l'irradiation UV ouvre cette fois-ci le canal alors qu'une irradiation à 525nm le referme et les profils sont bistables (Figure 4.18). Marqués par le MAS, ces deux mutants sont ouverts par une irradiation visible. Nous avons également testé le mutant I328S/S345C pour exclure la possibilité que la mutation du résidu I328 favorise un marquage entre deux résidus S345C. La présence de trimère pour le mutant I328C/S345C sur des gels SDS-PAGE en conditions réductrices après marquage par le MAM prouve définitivement un marquage inter sous-unités entre les résidus I328C et S345C (Figure 4.18).

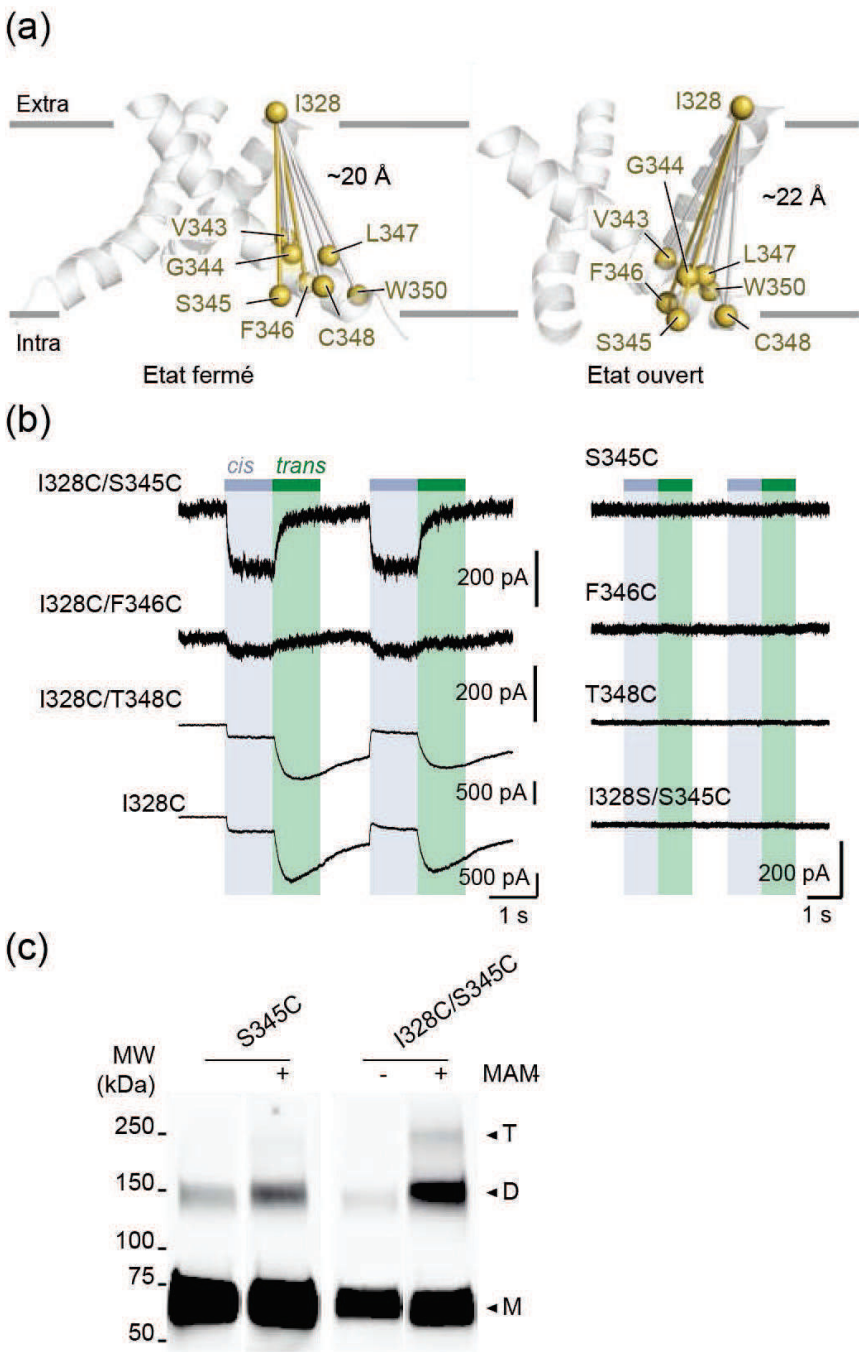


Figure 4.18 : Criblage vertical de la partie transmembranaire. (a) Cartographie des résidus mutés en cystéine pour le criblage par le MAM, vue longitudinale de TM2 sur un modèle par homologie de rP2X2 de l'état fermé (gauche) et de l'état ouvert (droite). Les sphères représentent les atomes Cβ des résidus mutés en cystéines. La distance indiquée est la moyenne des distances séparant les Cβ des résidus intra (V343-W350) et extracellulaires (I328) localisés sur deus sous-unités adjacentes (b) Exemples des différents profils électrophysiologiques enregistrés sur les mutants du criblage après marquage par le MAM (c) Gels SDS-PAGE des protéines de surface après marquage par le MAM. T signifie trimère, D dimère et M monomère.

- **Caractérisation biophysique**

Nous nous sommes focalisés sur le double mutant I328C/S345C qui présente le profil électrophysiologique le plus robuste. De la même manière que précédemment, les propriétés biophysiques du canal photorégulé ont été vérifiées. En terme de perméabilité, le canal reste cationique (P_{Cl}/P_{Na} =0,14 ± 0,03) avec une perméabilité calcique proche de celle d'un récepteur sauvage ouvert par l'ATP (P_{Ca}/P_{Na} = 1,53 ± 0,14). Par ailleurs, il présente une perméabilité partielle au NMDG (P_{NMDG}/P_{Cs} = 0,15 ± 0,01) signe d'une partielle dilatation du canal piégée par le MAM en configuration *cis*. Les enregistrements en canal unique en configuration oustide-out ne montrent cette fois-ci pas de déclin d'activité au cours de l'irradiation mais les événements d'ouverture sont très brefs et peu définis. L'analyse a permis de déterminer une conductance unitaire de 24,9 ± 0,7pS et la présence d'états intermédiaires d'ouverture (Figure 4.19). Cependant, au vu de la complexité des combinaisons possibles (1 à 3 MAM fixés, deux isomères pour chaque molécule) on ne peut attribuer chaque état sous-conductants à une configuration de la protéine précise.

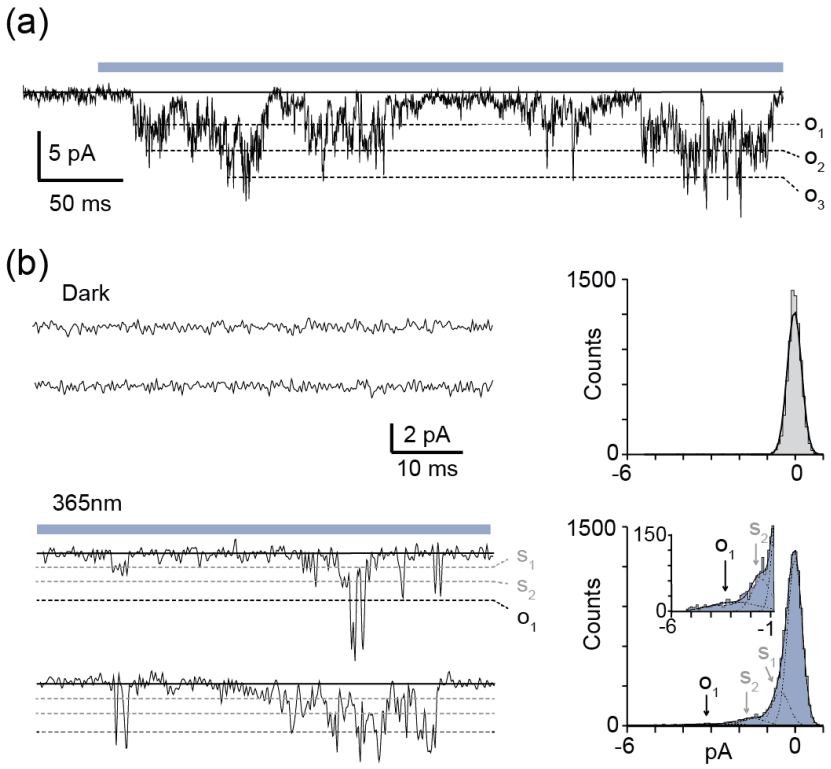


Figure 4.19 : Enregistrements en single-channel sur le mutant I328C/S345C marqué par le MAM. (a) Enregistrements électrophysiologiques sur cellules HEK exprimant le mutant I328C/S345C marqué par le MAM, à -120mV en configuration outside-out. Trois niveaux d'ouverture sont détectés (0_1-O_3). (b) Courants unitaires et histogrammes correspondants enregistrés avant (haut) et pendant (bas) une irradiation à 356nm sur le même patch exprimant le mutant I328C/S345C. S1 et S2 sont les états de conductances intermédiaires. Les histogrammes sont normalisés par une gaussienne (haut) ou la somme de trois gaussiennes (bas).

Ces données expérimentales démontrent que la réduction de la distance entre les extrémités intra et extracellulaires de deux segments transmembranaires adjacents permet l'ouverture du canal. Ce mouvement n'avait pas été anticipé par les structures cristallographiques (Table 4.4).

	crosslinking horizontal		crosslinking vertical	
état / isomère	fermé/cis	ouvert/trans	fermé/trans	ouvert/cis
X-Ray	16.1	27.7	20.8	23.2
MD	16.9	24.5	18.6	17.1
delta	*+0.8*	*-3.2*	*-2.2*	*-6.1*

Table 4.4 : Tableau comparatif des distances mesurées sur les structures cristallographiques et sur le modèle produit par dynamique moléculaire. Comparaison des distances (en Å) mesurées entre les C_β des résidus I328 (pour le crosslinking horizontal) et des résidus I328 et S345 de deux sous-unités adjacentes (pour le crosslinking vertical) sur les structures cristallographiques (X-ray) et entre les deux atomes de soufre suite au pontage de ces résidus par le MAM après relaxation par dynamique moléculaire (MD).

- **Couplage allostérique**

Nous avons par la suite exploré les répercussions du mouvement photoinduit au niveau du canal sur le site de liaison de l'ATP. En présence d'ATP, l'irradiation UV induit une potentiation des courants (1,4 fois) et un gain d'affinité apparente pour l'ATP (4 fois), ce qui suggère une modification allostérique induite par l'ouverture du canal en faveur d'un mouvement proche de celui induit physiologiquement (Figure 4.20).

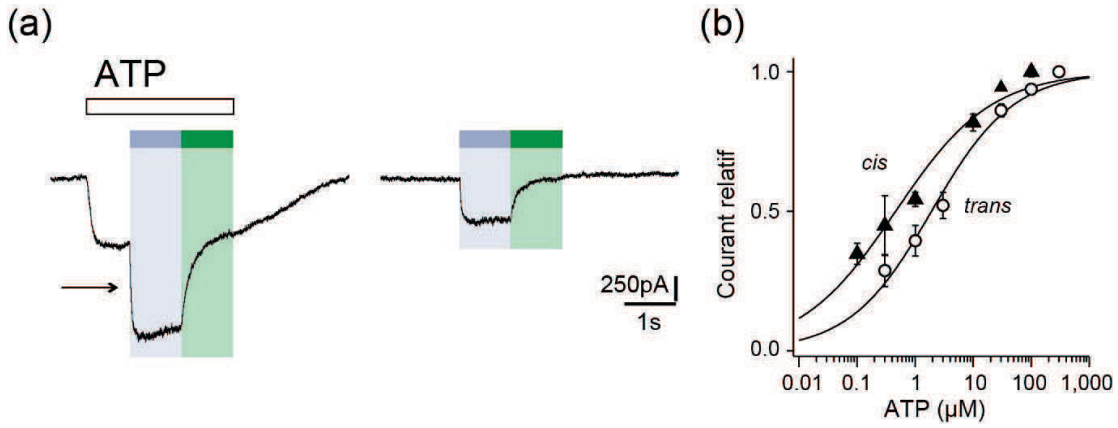


Figure 4.20 : Répercussions du mouvement photoinduit sur le site de liaison de l'ATP. (a) courants électrophysiologiques photoinduits enregistrés sur le mutant I328C/S345C marqué par le MAM en présence (gauche) ou en absense (droite) d'ATP. La fléche noire repésente le courant théorique attendu en cas d'additivité des courants. (b) courbes dose-réponse à l'ATP lors d'une irradiation à 525nm (cercles blancs) et après une irradiation à 356nm (triangles noirs). Les courants sont normalisés par rapport à la réponse à 100µM (365nm) ou 300µM d'ATP (525nm).

- **Caractérisation de la stœchiométrie de marquage**

Pour connaître la stoechiométrie de marquage par le MAM, nous avons conçu des concatémères permettant le pontage entre une, deux et trois interfaces. En terme de nomenclature, la lettre O représente l'absence de la mutation, la lettre C sa présence et les résidus sont cités dans l'ordre par sous-unité. Toutes les constructions sont fonctionnelles et aucune dégradation n'est détectée sur les gels SDS-PAGE. Aucun courant photoinduit n'est détecté sur les constructions n'ayant qu'une interface inter sous-unité (OC/OO/CO, OC/CO/OO, OO/CO/OC et CO/OC/CC), une intra sous-unité (OO/OO/CC) ou deux intra sous-unité (CC/OO/CC). Deux molécules sont donc nécessaires pour induire un courant lors d'une irradiation, et trois interfaces produisent un courant similaire à celui observé sur le récepteur trimérique après 20 minutes d'incubation (Figure 4.21). On peut ainsi estimer que notre marquage est presque total. Ces résultats démontrent d'une part que le marquage a bien lieu entre deux sous-unités adjacentes et surtout que le mouvement de deux interfaces est suffisant pour ouvrir le canal.

- **Proposition d'un nouveau modèle de gating**

Afin d'interpréter tous ces résultats d'un point de vue structural, des modèles moléculaires où le MAM contraint la structure ont été produits par nos collaborateurs N. Calimet et M. Cecchini à l'ISIS (Strasbourg). Lorsque le MAM est introduit sur la structure de l'état fermé, que ce soit entre deux résidus I328C (I336 sur zfP2X4) ou entre I328C et S345C (I336C et N353C sur zfP2X4), il y peu de modifications de la structure. En revanche, le pontage sur la structure ouverte rend, après relaxation par dynamique moléculaire, la structure plus compacte avec une réduction de la distance entre les extrémités extracellulaires (Table 4.4) et une diminution de la largeur des crevasses controversées (Figure 4.22). En absence du MAM, la structure de l'état ouvert est instable. Son introduction sur la structure de l'état ouvert permet d'introduire une contrainte suffisante pour empêcher l'obstruction presque immédiate du pore observée lors des simulations de dynamique moléculaire.

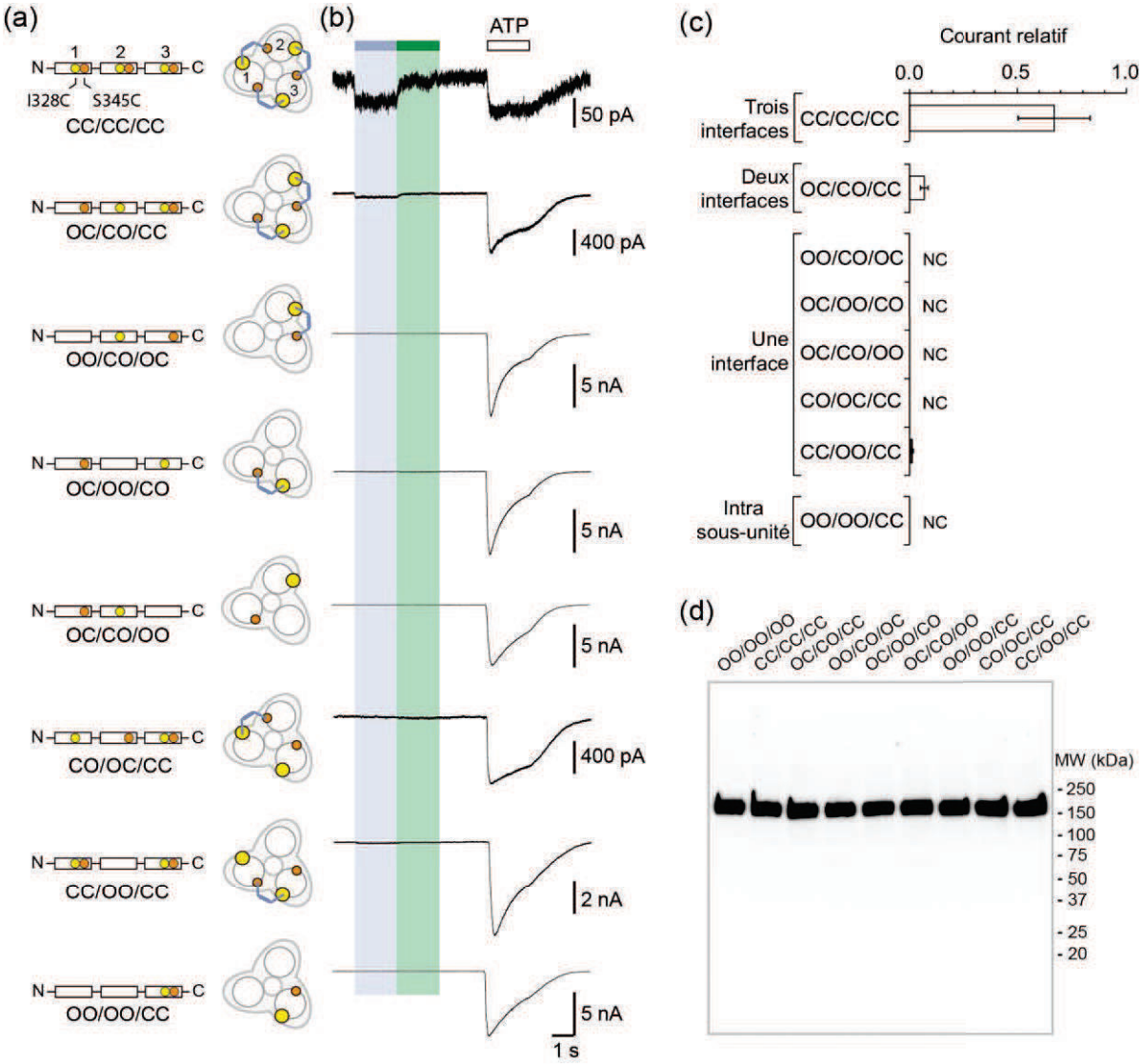


Figure 4.21 : Stoechiométrie d'activation par le MAM. (a) Représentation schématique des concatémères I328C/S345C rP2X2-3T testés. La sphère jaune représente la mutaion I328C, la sphère orange la mutation S345C. La lettre O indique que le résidu est celui du récepteur wild-type, la lettre C indique la présence de la mutation. Le MAM est représenté en bleu. (b) Courants électrophysiologiques photoinduits et lors d'une applicatrion d'ATP (100µM), enregistrés sur des cellules TSA-201 exprimant les différentes constructions marquées par le MAM. (c) Histogramme du ratio des courants induits par une irradiation UV par rapport à une concentration saturante d'ATP. (d) Gels SDS-PAGE des concatémères. Aucune dégradation n'est visible.

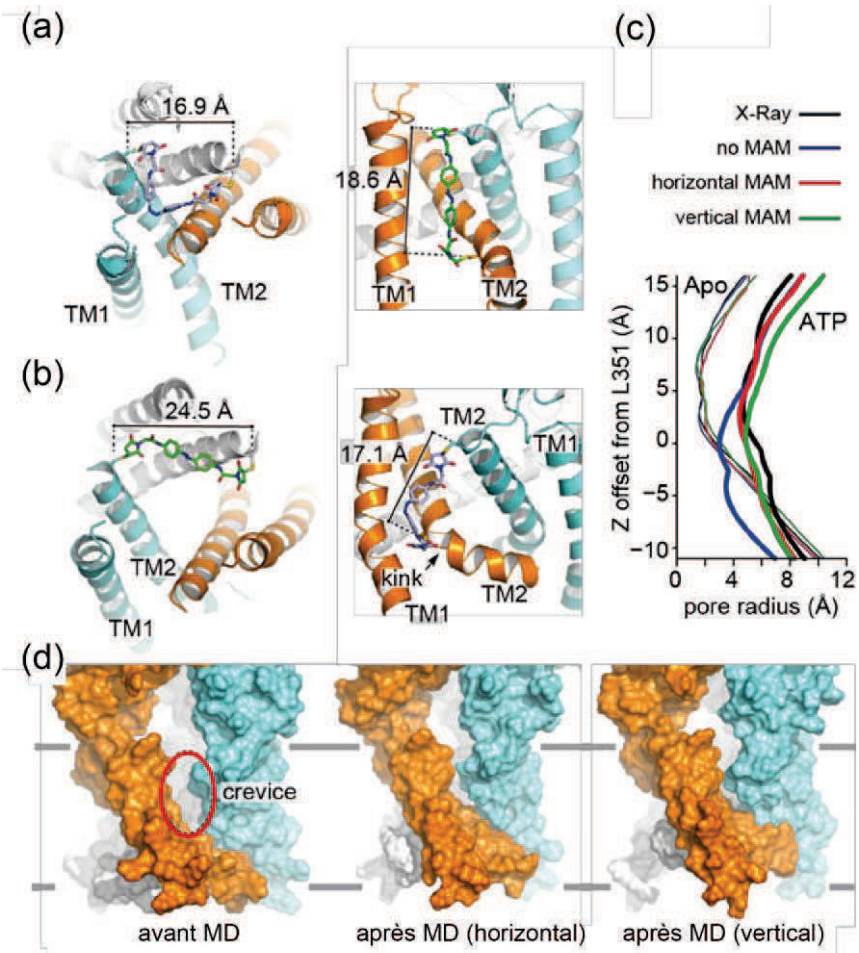


Figure 4.22 : Dynamique moléculaire du récepteur zfP2X4 ponté par le MAM. Représentation des segments transmembranaires de zfP2X4 dans l'état fermé (a) et dans l'état ouvert (b) suite aux simulations de dynamique moléculaire sur lesquels le MAM ponte horizontalement deux résidus I336C (gauche) ou verticalement I336C et N353C (droite). (c) diamètre du pore mesuré sur les strucutres cristallographiques (noir) et après simulation de dynamique moléculaire (rouge, bleu et vert) à parir des structures de l'état fermé (lignes fines) et de l'état ouvert (lignes épaisses). (d) vue latérale du canal ionique avant (gauche) et après simulations de dynamique moléculaire sur les structures sur lesquelles le MAM ponte horizontalement deux résidus I336C (milieu) ou verticalement les résidus I336C et N353C (droite).

Par ailleurs, les données concernant le pontage vertical tendent à prouver qu'il y a un rapprochement entre les parties intra et extracellulaires des domaines transmembranaires lors du gating, mouvement qui n'avait pas été anticipé par de précédentes études ni par les structures cristallographiques. Or il est difficile d'imaginer un tel mouvement au sein de la membrane où les structures secondaires de la protéine en hélices alpha sont relativement rigides et où les lipides environnant ajoutent une contrainte supplémentaire. L'explication avancée la plus plausible est une flexion de l'hélice TM2. Sur les structures cristallographiques, on peut observer une certaine courbure de l'hélice TM2 autour du résidu G350 (G342 sur rP2X2) mais la distances entre les résidus pontés par le MAM ne varie

pas entre les deux états. Il s'avère cependant que la glycine G342 rP2X2 est très conservée au sein des des différents sous-types de P2X, or il s'agit d'un résidu qui peut permettre une certaine flexibilité des hélices alpha. Nous avons donc émis l'hypothèse que cette glycine est un élément charnière au sein de l'hélice TM2 qui participe au gating en permettant une flexion relative du segment transmembranaire. Nous avons donc muté successivement en alanine (pour rigidifier l'hélice) et en proline (pour favoriser un coude) le résidu G342. Un gain de fonction de 25 fois est observé pour ce dernier mutant (EC_{50} = 1,6 ± 0,4µM) contrairement au mutant alanine qui présente une perte de fonction (EC_{50} = 94,1 ± 13,0µM). (Figure 4.23) Ces expériences confirment d'une part l'importance de cette glycine dans le phénomène de gating et d'autre part la pertinence du mouvement identifié par le pontage par le MAM.

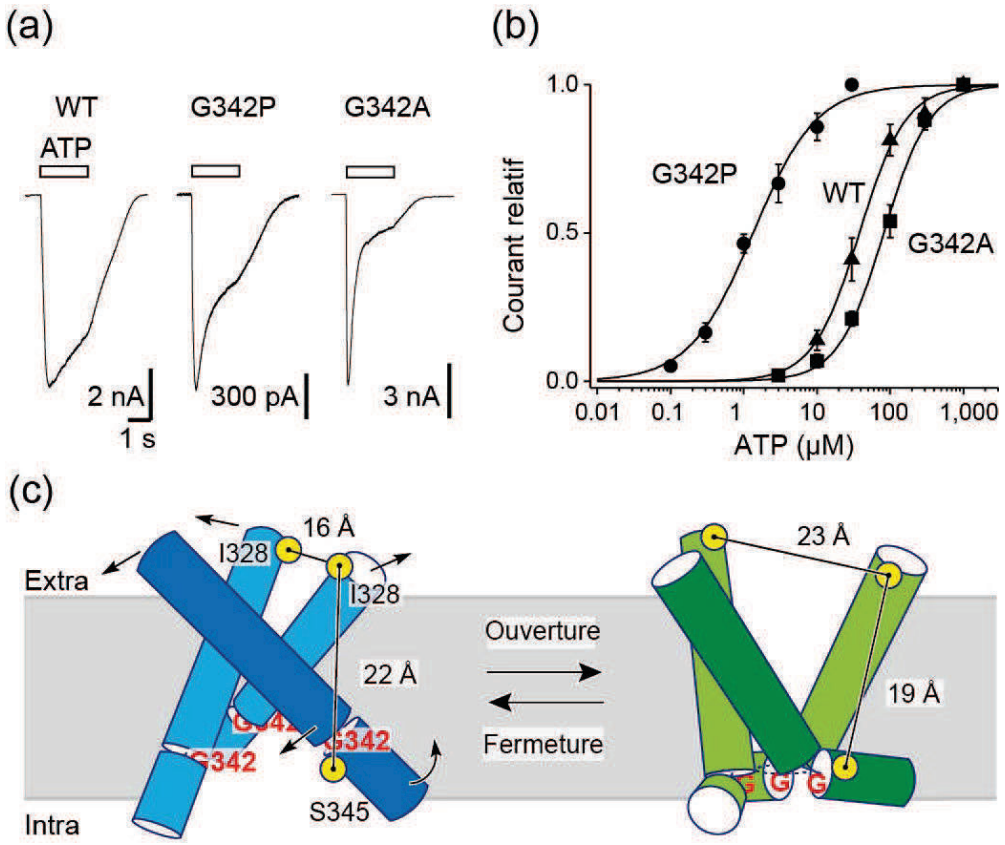


Figure 4.23 : Réarrangement des segments transmembranaires au cours de l'activation du récepteur P2X. (a) courants électrophysiologiques enregistrés sur des cellules HEK exprimant les différentes constructions lors d'une application d'ATP saturante (100µM pour G342P et 1mM pour le récepteurs WT et G342A) (b) courbes dose-réponse à l'ATP. (c) modèle de l'activation du récepteur rP2X2 intégrant toutes les données expérimentales collectées par le pontage par le MAM.

3.9. Discussion

Mise au point de la sonde moléculaire

Au cours de ce projet, nous avons démontré qu'un crosslinker photoisomérisable pouvait induire, au sein même d'une protéine, des changements conformationnels suffisants pour réguler son activité. Introduit dans des régions stratégiques de la protéine, l'isomérisation de la molécule est capable de reproduire un mouvement des sous-unités similaire à celui observé lors de l'activation par le ligand endogène. Ces résultats sont confortés par ceux d'une autre équipe travaillant également sur P2X, qui a démontré au cours de ma thèse la faisabilité de cette stratégie, en utilisant un dérivé plus court, le BMA (Figure 4.24), pour photoréguler le mutant P329C (Browne et al., 2014). Cependant, dans cet article, les auteurs ne procèdent pas à une étude systématique du phénomène de gating induit par leur molécule et suggère plutôt une utilisation pour le contrôle *in vivo* des récepteurs, alors que nous démontrons qu'il peut être utilisé comme un outil d'investigation moléculaire. Néanmoins, l'utilisation de cet outil nécessite de réaliser de nombreux contrôles. D'une part, comme nous l'avons montré avec l'utilisation du MAS et du MEA-TMA dans le projet précédent, l'attache par une seule extrémité d'une molécule dérivée d'azobenzène peut suffire pour induire un mouvement relatif des hélices et donc une ouverture du canal. De plus, il est nécessaire de vérifier que l'ouverture induite a une signification physiologique : les propriétés de perméation du canal étudié doivent être conservées afin d'exclure la possibilité de la formation d'un pore non sélectif au sein de la membrane par des mouvements aberrants.

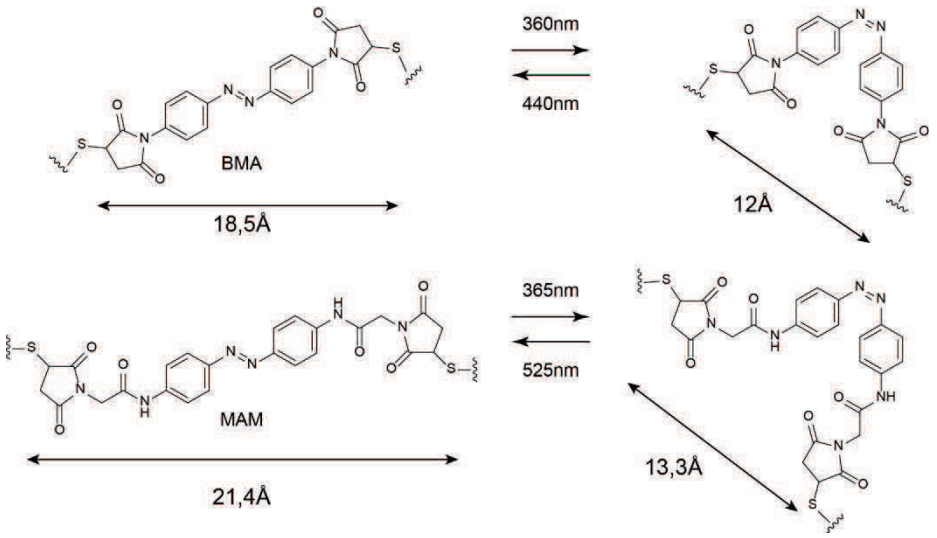


Figure 4.24 : Structures chimiques du BMA et du MAM fixés à la protéine et distances S-S des isomères *cis* et *trans*.

Dans le premier volet des résultats, nous avons vérifié que l'ouverture du canal induite par l'irradiation du mutant I328C marqué par le MAM était similaire à celle induite par l'ATP, ce qui semble être le cas même si certaines réserves pourraient être émises. En effet, la perméabilité chlore n'augmente pas, toutefois la perméabilité calcique diminue de 40% tout comme la conductance unitaire. Pour expliquer cette diminution, on pourrait avancer l'hypothèse que l'ouverture induite par le photocrosslinker est plus faible que celle induite par l'ATP, comme le suggèrent les données de distances issues des structures cristallographiques qui prédisent une expansion entre les résidus I328 de 27Å alors que notre molécule est trop courte pour explorer cette distance. Cependant, deux arguments vont à l'encontre de cette hypothèse. Si l'on estime que les données de distance issues de la structure cristallographique sont fiables, les résidus P329C auraient du ponter en présence du MAM car les distances prédites correspondent à celles explorées par le MAM, or ce n'est pas le cas. D'autre part, le BMA utilisé par l'équipe de North est une molécule plus courte qui ponte pourtant deux résidus P329C. La moindre amplitude d'ouverture observée avec notre sonde semble donc vraie et n'explique donc pas la diminution de la perméabilité et de la conductance. Une autre hypothèse possible est une obstruction partielle du canal par la présence du MAM à proximité du pore. Or, lors des simulations de dynamique moléculaire, cela ne semble pas être le cas. Une autre explication peut également être avancée : la perméabilité calcique peut être sous-estimée du fait d'une possible inhibition des courants par le calcium présent à forte concentration. De plus, les données d'enregistrements en canal unitaire sont très bruitées lors de l'irradiation avec des événements d'ouverture très courts. L'analyse des données est rendue difficile par le phénomène intense de flickering, la conductance moyenne a pu être mal évaluée. Il faut garder à l'esprit que seules deux cystéines sont pontées dans le cas du simple mutant I328C, l'isomérisation en *trans* ne force donc un mouvement qu'entre deux sous-unités. La troisième sous-unité est donc libre d'effectuer les transitions vers différents états. Ceci pourrait expliquer le profil très bruité obtenu en single channel où, en *sus* des phénomènes rapides d'isomérisation induisant un mouvement permanent, la troisième sous-unité viendrait ajouter un mouvement supplémentaire. En configuration cellule entière, les courants observés sont des moyennes des états de multiples récepteurs présents à la membrane et ce phénomène n'est donc pas visible. Par ailleurs, la potentiation de la réponse ATP lors d'une irradiation suggère

fortement un couplage entre le mouvement induit au niveau du canal et le site de liaison de l'ATP, cependant, nous n'avons pas pu prouver ce mouvement allostérique par la co-application d'antagoniste ou de potentiateur allostérique, ni même détecter de variation de l'affinité apparente pour l'ATP. Il est possbile que le mouvement relatif de deux sous-unités soit suffisant pour ouvrir le canal du fait de la proximité des résidus entre eux dans cette région, mais que ce mouvement ne soit pas suffisant pour se répercuter sur l'ensemble de l'ectodomaine et notamment sur le site de liaison. On ne peut donc pas conclure en faveur ou en défaveur d'un découplage. Enfin, on peut noter que la diminution des courants au cours de l'irradiation visible ressemble au phénomène de désensibilisation observé sur les récepteurs activés par l'ATP, ce point sera discuté dans une section ultérieure mais nous conforte quant à la pertinence des résultats obtenus : puisque la protéine impose des conformations , le pontage par le MAM n'explore donc pas des états déraisonnables.
Au vu de toutes ces données, il paraît donc légitime de conclure à une ouverture du canal proche de celle induite par l'ATP due à une expansion des extrémités transmembranaires extracellulaires. Cependant, l'amplitude de ce mouvement est diminuée de quelques angströms (~4Å) par rapport à celle prédite par les structures cristallographiques.

Nous avons donc démontré que le MAM n'était pas seulement un outil permettant de réguler l'activité du récepteur mais pouvait être envisagé comme une sonde moléculaire permettant de collecter des données de distances au cours d'un processus dynamique. Ces données peuvent alors être intégrées aux modèles existants du récepteur : l'introduction de telles contraintes a permis à nos collaborateurs de stabiliser l'état ouvert sur quelques dizaines de nanosecondes, résultats qu'ils n'avaient pas réussi à obtenir jusqu'alors.

Exploration structurale

Dans le deuxième volet de notre étude, nous nous sommes focalisés sur des mouvements inexplorés. Le criblage de la zone intracellulaire n'a pas donné de résultats positifs, plusieurs raisons peuvent être évoquées : le marquage n'a pas lieu car (i) les distances entre les résidus ne sont pas compatibles avec le MAM ou (ii) les conditions de marquage ne sont pas optimales et ne permettent pas à la molécule d'accéder aux résidus, (iii) ou le marquage a lieu mais l'isomérisation n'induit pas un mouvement efficace pour le gating. Les résultats préliminaires de biochimie semblent favoriser l'hypothèse d'une

absence de marquage, excepté peut être pour le mutant S345C où des dimères sont observés, mais pour lequel, en électrophysiologie, l'irradiation n'induit pas de courants.

Concernant l'exploration des mouvements relatifs entre les parties extra et intracellulaires, l'ouverture du récepteur est cette fois-ci induite par une irradiation dans le proche UV (365nm), suggérant un rapprochement des extrémités intra et extracellulaires lors du gating. Cependant, on ne peut écarter le fait que l'irradiation UV favorise un état *trans* du fait du recouvrement des spectres des distances explorées par les deux isomères même si la probabilité est faible. Toutefois, lors des simulations de dynamique moléculaire, l'isomère *cis* fixé au sein de la protéine a une distribution des distances séparant les deux maléimides beaucoup plus réduite qu'en solution et centrée sur une valeur de 17Å. Ce résultat combiné à la suite des travaux concernant l'induction d'un coude au sein de l'hélice pour favoriser le gating me paraîssent être des arguments fort pour écarter cette possibilité.
Par ailleurs, un point essentiel de ces travaux est l'observation d'une répercussion du mouvement photoinduit sur le site de liaison du ligand endogène mis en évidence par le gain d'affinité apparente pour l'ATP lors d'une irradiation à 365nm. Ceci prouve que le mouvement induit au niveau du canal n'est pas isolé et qu'il se répercute à l'ensemble de la protéine, un argument en faveur d'un mouvement proche de celui induit physiologiquement par l'ATP.

Plusieurs autres points intéressants sont à souligner. Nous utilisons le résidu I328C dans la partie extracellulaire alors qu'il ponte seul avec le MAM, on pourrait donc envisager une compétition entre les pontages extracellulaires et transmembranaires mais ce n'est pas le cas. Ceci est du en grande partie à l'hydrophobicité du MAM qui vient préférentiellement s'insérer dans les membranes. La molécule peut alors atteindre le résidu S345C facilement ce qui augmente fortement la probabilité de réaction avec le résidu I328C. Les concentrations nécessaires au marquage par le MAM du double mutant sont de ce fait très faibles (<5µM) ce qui est un avantage considérable pour son utilisation. Dans le cas où seul le résidu I238 est muté en cystéine, le MAM doit passer par les vestibules extracellulaires donc dans un environnement hydrophile pour atteindre le résidu, ce qui est défavorable.
Les concatémères nous ont permis de confirmer que le marquage avait bien lieu entre deux résidus issus de deux sous-unités différentes, fait déjà établi par les gels SDS-PAGE, mais les

résultats obtenus suggèrent également la nécessité d'un mouvement d'au moins deux interfaces pour obtenir une ouverture efficace. Ceci diffère des résultats obtenus avec le simple mutant I328C puisqu'une seule molécule est alors fixée et induit l'ouverture. Il semble donc que dans la partie extracellulaire, l'écartement de deux sous-unités soit suffisant pour ouvrir le canal mais qu'un réarrangement de deux interfaces TM2-TM2 au niveau transmembranaire soit nécessaire pour obtenir le même effet. Ces données sont en adéquation avec le fait que la liaison de deux molécules d'ATP suffise pour activer le récepteur.

Néanmoins, on peut remarquer une certaine divergence entre les résultats électrophysiologiques et ceux des gels SDS-PAGE : en effet, la proportion de trimères donc de récepteurs pontés par deux molécules de MAM est très faible alors que les courants de photorégulation sont importants. Une hypothèse avancée est une perte des cellules marquées lors des différentes étapes du protocole de biochimie du fait de leur plus grande fragilité, provoquant un enrichissement artéfactuel en récepteur non marqué. Il y a donc un biais dans les proportions relatives observées. En outre, lors des expériences d'électrophysiologie, les cellules qui ne répondent pas à l'irradiation sont systématiquement écartées, on favorise donc les cellules marquées efficacement, ce qui peut expliquer la différence avec les gels.

Concernant les propriétés biophysiques du canal ouvert par une irradiation UV, on observe une perméabilité au NMDG partielle, signe d'un pore en partie dilaté, contrairement à ce que l'on avait observé auparavant pour le simple mutant. Les deux états photoinduits sont donc différents et notre sonde permet d'explorer différentes transitions.

Nouveau mouvement identifié : une flexion de l'hélice

Enfin, les résultats obtenus avec notre sonde sur le double mutant suggèrent un rapprochement des extrémités intra et extracellulaires au cours du gating. Or les hélices α sont des structures relativement rigides et seul un point de flexion au sein de l'hélice permet d'envisager cette hypothèse. La présence d'une glycine quasi canonique en position 342 sur rP2X2 nous a paru être une piste intéressante pour tester cette conjecture et l'observation d'une certaine courbure de la partie intracellulaire de TM2 sur la structure cristallographique de l'état ouvert nous a conforté dans notre choix. Le gain de fonction important (25 fois) observé suite à l'introduction d'une proline corrobore cette hypothèse. Cependant, lors des

simulations de dynamique moléculaire réalisées avec le crosslinker fixé en position verticale, cette courbure de l'hélice est certes visible mais située un tour d'hélice plus bas. Malgré tout, ces simulations sont loin d'être le reflet exact de l'état du récepteur et cette absence de flexion *in silico* ne doit pas écarter les données fonctionnelles.

Le modèle moléculaire produit tient compte des données de distances obtenues avec notre sonde et des sites de métallation ingéniérés par d'autres équipes. Un des problèmes soulevés est la large distribution des distances explorées par l'isomère *cis* sans nécessiter beaucoup d'énergie, ceci étant du à la libre rotation des groupements maléimides fixés sur un carbone sp3. Ceci pourrait limiter la pertinence des contraintes introduites en utilisant l'isomère *cis*. Toutefois, ces mesures ont été réalisées sur un composé en solution et il est peu probable qu'une fois fixé, il puisse avoir le même comportement, la protéine doit imposer des contraintes suffisantes pour limiter les mouvements de la molécule. Lors des simulations de dynamique moléculaire, nos collaborateurs observent en effet cette restriction avec un pic bien résolu de l'isomère *cis* à 17Å. Cependant, dans une optique d'exploration structurale d'autres protéines dont on ne possède pas de modèle, la conception d'autres molécules moins flexibles pourrait être une voie à envisager pour palier à ce problème mais introduire une trop grande rigidité peut également être néfaste en empêchant le marquage. Néanmoins, le pontage par nos crosslinkers sur les modèles issus des structures cristallographiques permet de stabiliser un état ouvert plus compact, qui restaure certaine interactions inter sous-unités et diminue la taille des crevasses controversées, ce qui semble plus compatible avec un état physiologique du récepteur. D'autres simulations sont en cours pour améliorer ce nouveau modèle d'un état ouvert.

Nous avons donc mis au point un outil d'exploration des transitions allostériques du récepteur P2X, permettant de sonder des mouvements relatifs au sein de la protéine et de collecter, notamment avec l'isomère *trans,* des données de distance particulièrement utiles pour l'amélioration des modèles existants du récepteur. Cet outil nous a permis de détecter un mouvement essentiel au gating jusqu'alors ignoré.

3.10. Article 2 : Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel

Article en cours de préparation en vue d'une soumission dans le journal JACS

Photo-switchable tweezers illuminate pore-opening motions of an ATP-gated P2X ion channel

Chloé Habermacher,[†,§] Adeline Martz,[†,§] Nicolas Calimet,[‡] Damien Lemoine,[†,§] Laurie Peverini,[†,§] Alexandre Specht,[†,§] Marco Cecchini,[‡] and Thomas Grutter[†,§,*]

[†]Centre 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; [§]Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, F-67400 Illkirch, France; [‡]ISIS, Unité Mixte de Recherche 7006, Laboratoire d'Ingénierie des Fonctions Moléculaires, F-67083 Strasbourg, France.

Azobenzene/ channel gating mechanism.

ABSTRACT: P2X receptors function by opening a transmembrane pore in response to extracellular ATP. Recent crystal structures solved in apo and ATP-bound states revealed molecular motions of the extracellular domain following agonist binding. However, the mechanism of pore opening still remains controversial. Here we use photo-switchable cross-linkers as 'molecular tweezers' to monitor a series of inter-residue distances in the transmembrane domain of the P2X2 receptor during activation. These structural constraints combined with computational studies provide high-resolution models of the channel in open and closed states. We show that the extent of the outer pore expansion is significantly reduced compared to the X-ray structures. Our data further reveal that a vertical shrinking of the inner and outer ends of the pore-lining helices, likely through a hinge-bending motion, is essential for activation. These results provide new insight into the gating mechanism of P2X receptors and establish a general strategy for detailed investigations of membrane proteins.

The family of P2X receptors encompasses in mammals seven subtypes (termed P2X1-7) that are widely expressed throughout many tissues, including neurons.[1] These receptors are trimeric ion channels that switch rapidly between closed and opened conformations in response to extracellular ATP.[2,3] Once opened, a flow of ions (sodium, potassium and calcium) transit through the transmembrane pore and initiates signal transduction. Depending on the P2X subtypes, gating is followed by desensitization, a temporary inactivation that terminates the ion flow. ATP-gated P2X receptors are also involved in a wide range of pathological disorders, including chronic and inflammatory pain.[1,4] A detailed understanding of the molecular mechanisms underlying the gating process is thus of fundamental importance and may open up new therapeutic avenues.

Recent X-ray structures of the zebrafish P2X4 (zfP2X4) receptor in its apo and ATP-bound states provided a molecular framework of how ATP binding triggers channel opening.[5,6] There are three interfacial ATP-binding pockets in the extracellular domain (ECD) that protrude ~40 Å outside from the membrane. The transmembrane domain (TMD) comprises six transmembrane (TM) spanning α-helices, two from each subunit termed TM1 and TM2, that are arranged around the three-fold axis of symmetry, with TM1 positioned peripheral to TM2. The pore-lining TM2 helices are steeply angled nearly 45° from the membrane plane and in the apo state, they form a gate in the middle of the membrane that is thought to control the flux of ions. For this reason, the apo form is believed to represent a resting, closed state of the receptor.[5]

Structural and functional works suggest that binding of ATP induces closure of the three interfacial pockets in the ECD that is accompanied by a rearrangement of the subunit-subunit interfaces.[6-18] As a result, the lower region of the ECD undergoes a flexing motion that pulls apart the outer ends of the six TM helices.[6] This lateral displacement, in turn, enlarges through an iris-like opening the narrowest part of the channel, creating a wide entryway of 7 Å in diameter, which allows ions to flow through the open pore.[6] This mechanism of gating is largely consistent with previous data, at least in the ECD[10-18] and with respect to the outer end of the TM helices.[19-24] However, there are reasons to question whether the ATP-bound structure provides an accurate blueprint of a native open-channel state. First, the proposed gating mechanism implies a radial outward movement of the TM helices away from the three fold axis, which consequently creates large 'crevices' between the TM helices of adjacent subunits, resulting in a loosely packed TMD. Although endogenous lipids have been suggested to occupy these gaps,[6] a recent molecular modeling study has suggested that these crevices are not present in membrane embedded receptors.[24] Second, metal bridges experiments suggest that the inner portion of TM2 helices narrows as the channel opens,[21,22] a feature that is not clearly visible from the ATP-bound

structure.[6] Third, to obtain diffracting crystals, proteins were extensively truncated at both the amino and carboxy termini and solubilized with detergent.[6] Although the truncated receptor was functional, the lack of the intracellular domains, which critically controls the function of the receptor,[25-27] may distort somewhat the pore structure, raising the possibility that X-ray data may represent a non-native, open-channel structure. Hence, additional data are needed to understand the gating mechanism of a full-length, membrane-embedded P2X receptor.

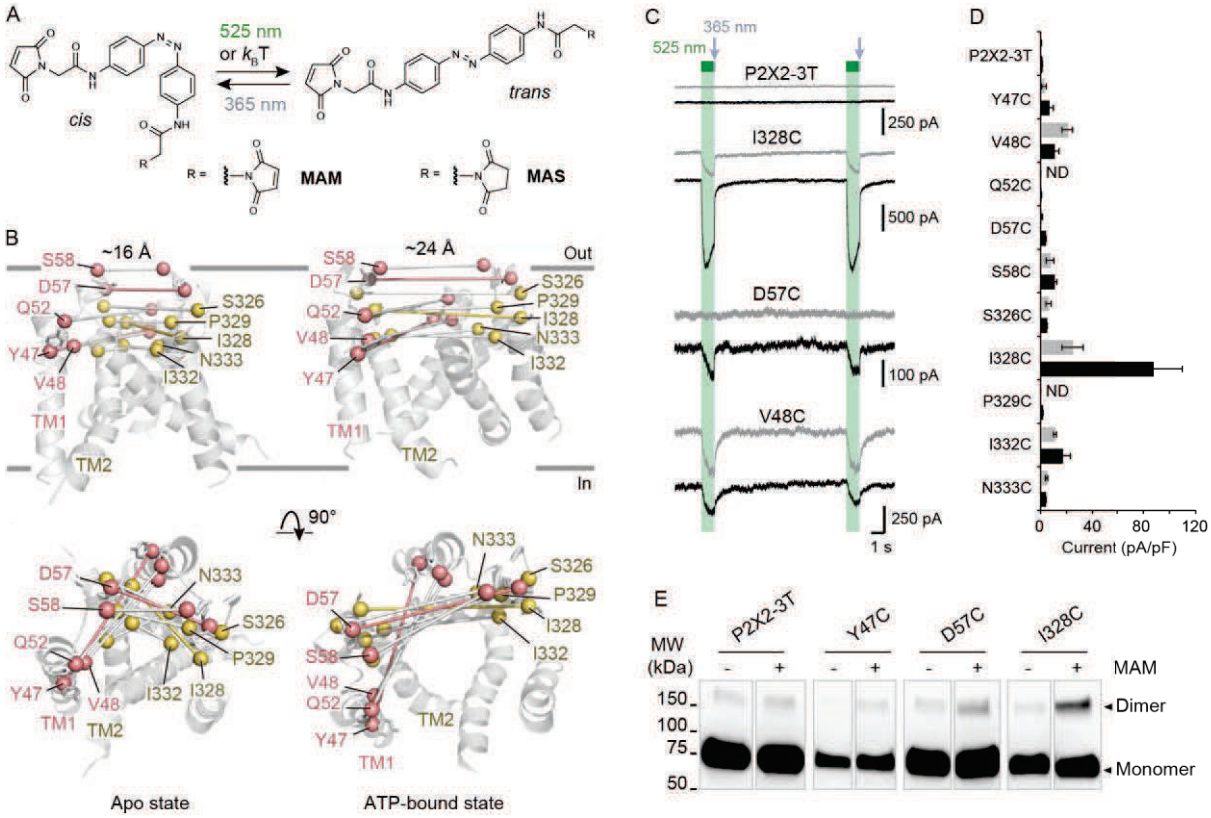


Figure 1. Lateral expansion between TM1 and TM2 helices drives channel opening. (A) Chemical structures of MAM and MAS in the *cis* and *trans* states. (B) Cartoon representation of the TMD of a P2X2 homology model viewed parallel (upper) and perpendicular (lower) to the membrane plane in an apo (left) and ATP-bound state (right). C_β atoms of residues selected for cysteine substitutions are shown as red and yellow spheres in TM1 and TM2 helices, respectively. Indicated values are the average distances separating pairwise β-atoms from two adjacent subunits (grey bridges). Highlighted bridges indicate actual MAM cross-linking. (C) Whole-cell currents recorded during and after illumination at 525 nm (green bar, 1 s) and 365 nm (violet arrow, 80 ms) in HEK cells expressing the P2X2-3T receptor or the indicated cysteine-substituted mutants after treatment with MAM (black traces) or MAS (gray traces). Just before recordings, cells were irradiated for 85 ms with a light pulse of 365 nm. (D) Screening for all constructs showing light-gated currents following MAM (filled bars) or MAS (gray bars) treatment. All light-gated mutants were activated at 525 nm and inactivated at 365 nm, except for N333C, which responded in the opposite sense to these wavelengths. ND stands for not determined (n = 4-5 cells; mean ± s.e.m.). (E) Western blot analysis of cell-surface cross-linking of the indicated P2X2-3T constructs expressed in TSA-201 cells after treatment (+) or without treatment (-) with MAM. Monomer and dimer are indicated. Uncut gel image is in Figure S2B. MW, Molecular weight.

In this study, we unravel the gating motion of the rat P2X2 (rP2X2) receptor by crosslinking engineered cysteine residues in the TMD with photo-switchable azobenzene tweezers, for which the end-to-end distance can be controlled by light. A set of structural constraints combined with modeling studies provided high-resolution models of the pore in both the open and closed states in their physiological environment. We provide new insight into the pore-opening motions of this major class of ligand-gated ion channels.

Results

Designing the photo-switchable tweezers strategy

To collect structural constraints related to channel gating, we synthesized 4,4′-bis(maleimidoglycine)azobenzene (MAM), a semi-rigid photo-switchable azobenzene cross-linker carrying two sulfhydryl-reactive maleimides known to cross-link pairs of engineered cysteine residues (Figure 1A and Figure S1A). In solution, MAM isomerizes from *trans* to *cis* configuration at 365 nm and reversibly switches back to the *trans* isomer at 525 nm (Figure S1B) or by thermal relaxation. As a consequence, the end-to-end distance of MAM can be changed by light from 21.4 ± 2.0 Å in the *trans* state to 13.3 ± 4.3 Å (n = 100,000 conformers) in the *cis* state, as meas-

ured from the distribution of the S-S distance in explicit-water molecular dynamic (MD) simulations (Figure S1C).

Horizontal screening confirms an outward expansion of the TM helices

Guided by P2X2 homology models[28] built from zfP2X4 X-ray structures of the apo (PDB code: 4DW0)[6] and ATP-bound states (4DW1)[6] we selected within the TMD pairs of residues to be mutated into cysteine. We chose water-accessible, extracellular positions for which the interatomic distances of their β-atoms of at least one of the X-ray structures closely match the end-to-end distance of MAM (Table S1). Furthermore, to limit all possible combinations, only homologous pairwise positions were considered. Therefore only one MAM molecule is expected to cross-link horizontally two adjacent subunits within a receptor. With these criteria, we identified in TM1 and TM2 ten residues (Figure 1B) and substituted each of them with a cysteine into the P2X2-3T background, a functional receptor in which three native cysteines were mutated to threonine,[20] and expressed the single mutants in HEK cells. All cysteine mutants responded robustly to ATP, as assayed by whole-cell patch-clamp electrophysiology, and displayed half-maximal effective concentrations (EC_{50}) of ATP that were similar to those previously determined (Table S2).[20,28]

We screened each mutant by recording currents in response to light irradiation from cells treated with MAM for 20 minutes in the dark. Because MAM is expected to open the channel in the *trans* isomer, cells were illuminated at 365 nm prior to 525 nm. No light-gated currents were observed for the P2X2-3T, Q52C and P329C mutants (Figure 1C and D and Figure S2A). However, for all remaining mutants, channels reversibly opened at 525 nm light and closed at 365 nm light, except for N333C, which responded weakly in the opposite sense to these wavelengths (Figure 1C and D and Figure S2A).

To confirm that these currents originated from successful cross-linking of two adjacent cysteines, we designed another azobenzene derivative, named MAS, in which one of the two maleimides was replaced by the isosteric, sulfhydryl non-reactive succinimide (Figure 1A and Figure S1A). In these conditions, MAS molecules are expected to react with a single cysteine without cross-linking. Control experiments with MAS revealed that the majority of the light-gated currents were indistinguishable from those originating from MAM treatment (Figure 1C and D and Figure S2A), suggesting that MAM actually does not cross-link adjacent subunits. However, for three mutants (Y47C, D57C and I328C) there was clear evidence for MAM cross-linking. There was no light-gated current for D57C mutant following MAS treatment and responses of the mutants Y47C and I328C to MAM exhibited clear differences relative to MAS in current amplitudes (Figure 1D), on-rate kinetics and stability in the dark (Figure S3A-D). Moreover, biochemical experiments clearly showed that the I328C mutated protein, and not P2X2-3T, migrated on sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) at the position expected for dimeric cross-linked subunits only after MAM treatment (Figure 1E). Similar results were also obtained for Y47C and D57C mutants (Figure 1E). Because these three residues are located at the outer ends of the TMD, these data demonstrate, in agreement with X-ray structures,[6] that a lateral outward motion of both TM1 and TM2 drives channel gating.

An interesting behavior of the azobenzene was revealed when channels previously turned off by a brief illumination at 365 nm were still able to respond to the same wavelength of light, although currents were smaller than those elicited at 525 nm light, as exemplified for the I328C mutant (Figure S3E). As these results were only observed with MAM, they suggest that the channel acts as a 'lever' to maintain in its resting state the cross-linked azobenzene in the high-energy *cis* state. Consistent with photostationary states, a small but significant proportion of *trans* state is formed at 365 nm besides the large proportion of *cis* state, causing the small inward currents.

Light-gated motions as mimicry of ATP-gated motions

To evaluate the physiological relevance of the light-driven motions, we determined key biophysical features of the light-gated channels and compared them to those of channels activated by ATP. We focused on the I328C mutant because it gave the most robust currents. First, we found that the rate of activation by light (time constant $\tau = 131 \pm 9$ ms, n = 8, Figure 2A) closely resembled that induced by a saturating concentration of ATP for the wild-type P2X2 receptor (300 μM; $\tau = 128 \pm 11$ ms, n = 4).[29]

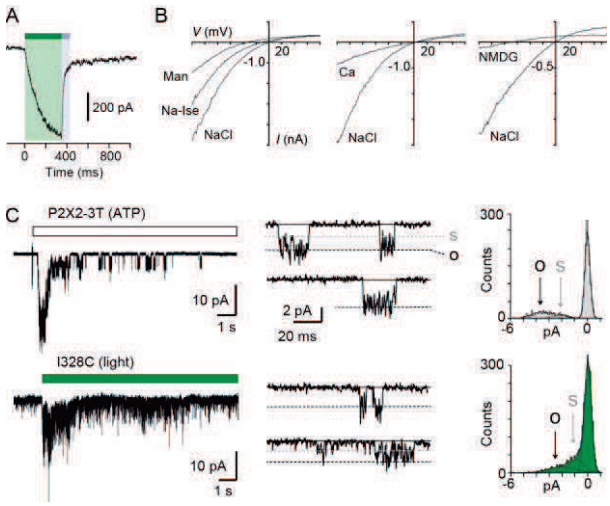


Figure 2. Light-driven open states are similar to those induced by ATP in the I328C mutant. (A) Optimized illumination times at 525 nm (350 ms) and 365 nm (80 ms) of I328C mutant treated with MAM to observe maximal opening and closing. (B) Current-voltage curves recorded in different extracellular solutions (Man, mannitol; Na-Ise, sodium isethionate; Ca, calcium; NaCl, symmetrical NaCl external solution). Shown are light-gated currents obtained after subtracting peak photocurrents recorded at 525 nm light to those obtained in the dark after switching to 365 nm light. (C) Left, single-channel currents recorded from outside-out patches at -120 mV in response to ATP for the P2X2-3T (10

μM, upper panel) or to 525 nm illumination for I328C mutant treated with MAM (4.1 mW/mm^2, lower panel). In these conditions, both ATP- and light-gated currents correspond to ~30% of a maximal ATP response. Middle, unitary currents shown on an expanded scale. Full (O) and sublevel (S) openings are indicated by dashed black and gray lines, respectively. Black lines indicate closed channels. Right, corresponding all-points histograms, fitted to the sum of three Gaussians. Full and sublevel openings are also indicated.

This suggests that light and ATP open the channel with similar kinetics, although light source intensity and conditions of ATP application were not optimal. Second, increasing time treatment with MAM from 5 to 40 minutes increased the relative amount of light-gated currents relative to maximal ATP-gated currents from 20 ± 7 to 60 ± 5% (n = 7-9), demonstrating that light promotes gating motions that are nearly as efficient as those induced by ATP (Figure S4A-C). Third, light-gated currents rapidly inactivated in the dark, and currents can be recovered from inactivation by switching back to the *cis*-isomer (Figure S5), two processes that are reminiscent of P2X desensitization and resensitization, respectively. As inactivation was partial as shown by small subsequent activation at 525 nm (Figure S5A), this suggests that some amount of the *trans* state spontaneously switched back to the *cis* state. Fourth, channels opened by light at 525 nm increased by two fold the maximal ATP response without changing ATP sensitivity relative to control, suggesting MAM-induced motions are functionally linked to ATP function (Figure S4 D and E, and Table S2). Fifth, we found that light-gated channels remained selective to cations (Table S3) and showed calcium permeability that was somewhat lower than that of the ATP-gated P2X2-3T (Figure 2B and Table S4).[28] In addition, as P2X2 receptors are well known to undergo "pore

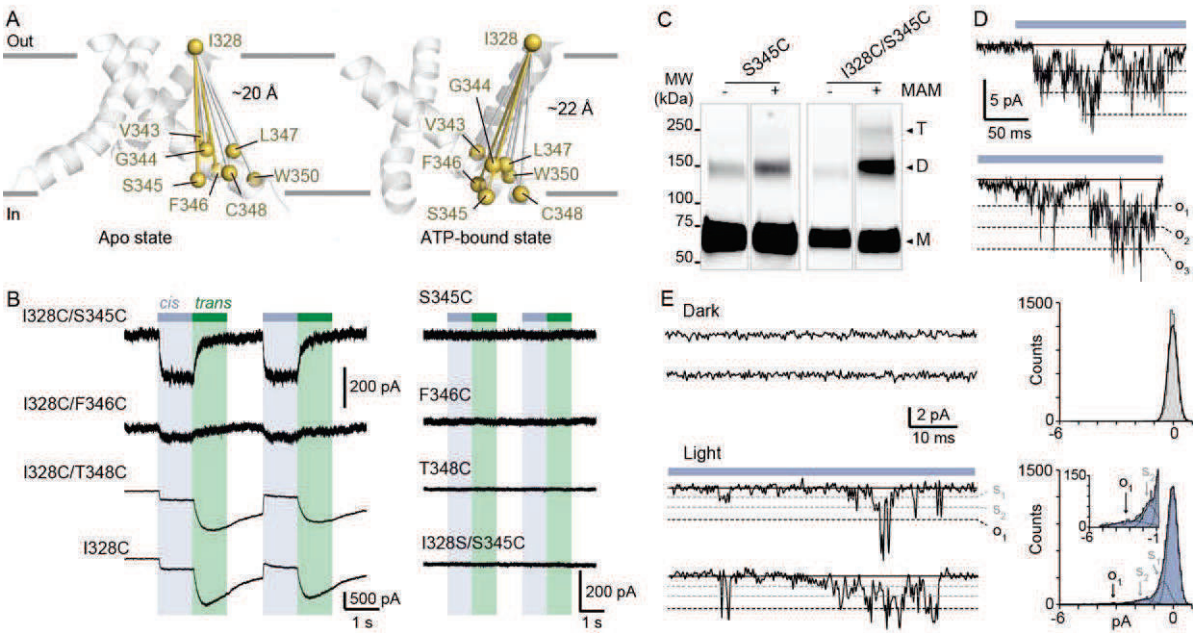


Figure 3. Shortening of the vertical distance separating adjacent TM2 ends drives channel openings. (A) Side views of TM2 helices of a P2X2 homology model in the apo state (left) and ATP-bound state (right). The β-atoms of residues selected for cysteine substitutions are shown as yellow spheres. Indicated values are the average distances separating pairwise β-atoms from two adjacent TM2 helices (grey bridges). Highlighted bridges between residues indicate actual MAM cross-linking. For clarity, TM1 helices were omitted. (B) Whole-cell currents evoked by light at 365 nm (*cis*) or 525 nm (*trans*) in HEK cells expressing the indicated cysteine-substituted mutants treated with MAM. (C) Western blot analysis of cell-surface cross-linking of the indicated mutated subunits expressed in TSA-201 cells after treatment (+) or without treatment (-) with MAM. Monomer (M), dimer (D) and trimer (T) are indicated. Uncut gel image is in Figure S6C. MW, Molecular weight. (D) Single-channel currents recorded from an outside-out patch expressing the I328C/S345C mutant at -120 mV in response to 365 nm illumination. Three simultaneous openings (O) indicated by dashed black lines were detected. Black lines indicate closed channels. (E) Unitary currents (left) and corresponding all-points histograms (right) recorded before (upper) and during 365 nm illumination (lower) from the same patch expressing the I328C/S345C mutant. Sublevel openings (S1 and S2) are indicated by dotted gray lines. Inset shows expanded scale. All-points histograms were fitted to one Gaussian (upper) or to the sum of four Gaussians (lower).

dilation" after prolonged ATP application,[30-32] which is defined by a progressive increase in permeability to large organic cations, such as N-methyl-D-glucamine (NMDG), we tested the ability of NMDG to permeate light-gated channels. No NMDG current was detected after 525 nm light switching (Table S5), suggesting that the open state reached by MAM in the *trans* configuration is not trapped in a dilated, open-channel state (Figure 2B). Last, to determine the unitary conductance of the light-gated receptors, we carried out single-channel recordings (Figure 2C).

Control experiments showed that the main conductance state (O) of channels opened by ATP in outside-out patches excised from cells expressing the P2X2-3T channel was somewhat higher than that previously determined for the WT P2X2 receptor.[33,34] This increase of ATP unitary current enabled us to detect an additional low-conductance substate (S), a feature that has already been reported to occur occasionally for the WT P2X2 receptor (Figure 2C and Table S6).[35] In agreement with the macroscopic recordings, illumination at 525 nm of patches excised from MAM-treated cells expressing the I328C mutant induced a peak current that rapidly declined to a steady-state level of activity, where individual openings and closings can be detected (Figure 2C). Compared to the WT P2X2 receptor, currents were highly flickery and accurate determination of the open and shut times could not be made. However, analysis of the all-points histograms showed that channels appeared to open to multiple conducting levels, as observed for the ATP-gated P2X2-3T receptor. The highest conductance state (O) of the light-gated currents that was detected was somewhat lower (~35%) than that of the WT P2X2 receptor (Table S6). This reduced conductance may be explained by the fact that during activation of the pore only two tethered subunits of the trimer move abruptly while the third one may reside in its close conformation. While further analysis deserves to be done, these results suggest that the open states reached by MAM under light irradiation are not fundamentally dissimilar to those naturally populated by ATP.

Vertical screening identifies shrinking of adjacent TM2 ends during activation

We next investigated movements of the pore that occur during activation along an axis that is perpendicular to the membrane plane. We paired the mutation I328C from the extracellular apex of one TM2 with cysteine substitutions made from the intracellular side of another (from V343 to W350; Figure 3A), thus designing double cysteine mutants. To distinguish vertical *versus* horizontal cross-linking, light-gated currents were systematically compared with those originating from I328C mutant alone. All single and double mutants gave robust ATP currents, except for D349C and I328C/D349C, which were not functional (Table S2). Following MAM treatment, none of the single internal pore mutants responded to light (Figure 3B and Figure S6A). In contrast, all of the functional double mutants were light sensitive, but for most of them the activation at 525 nm was very similar to that of I328C mutant, suggesting that cross-linking occurs primarily between two adjacent I328C mutant subunits (Figure 3B).

The situation was, however, different for the I328C/S345C mutant (and to a lesser extent I328C/F346C), for which channels opened in the *cis* state and closed in the *trans* state (Figure 3B). In control experiments, channels treated by MAS responded to these wavelengths in the opposite senses (Figure S6B), and no light-gated current was recorded when cells expressing the serine mutant I328S/S345C were treated with MAM (Figure 3B). Biochemical experiments firmly demonstrated inter-subunit cross-linking between I328C from one subunit and S345C from another, as visualized by the expected occurrence of dimeric and trimeric cross-linked species (Figure 3C). These data thus suggest that shortening the distance between the inner and outer ends of adjacent TM2 helices drives channel opening, a motion that was not anticipated by X-ray structures

Cross-linking efficiency was higher for I328C/S345C than for I328C, as evidenced by the fact that light activated channels at 60 ± 7% (n = 13 cells, preincubation time of 20 minutes) of a maximal whole-cell ATP response, a value that was higher than that measured for I328C at the same preincubation time (31 ± 4%). This suggests that rates of vertical cross-linking between I328C and S345C are higher than those observed horizontally involving two I328C mutated subunits. Furthermore, in contrast to I328C, light-gated currents were stable in the dark, suggesting that these light-driven motions did not induce apparent desensitization (Figure S7A).

Next, we determined ion permeability and single-channel conductance of the light-gated channels. Engineered I328C/S345C channels opened by *cis*-MAM were still largely selective for sodium over chloride ions (Table S3), and displayed calcium permeability that was higher than that of I328C mutant, but lower than that of the WT P2X2 receptor (Figure S7B and Table S4). A small but substantial NMDG permeability (around 15%) was recorded (Table S5), suggesting that *cis*-MAM partially induces pore dilation. This last result reveals that MAM molecule has the ability to trap different ion permeability states. Last, in outside-out patches, channels opened stepwise after 365 nm illumination to discrete levels of conductance with no apparent decline of the activity, in agreement with macroscopic recordings (Figure 3D). Unitary currents of the highest conducting level (O_1 in Figure 3E) were higher than those of MAM cross-linked I328C mutant and resembled those of the P2X2-3T receptor activated by ATP, although the probability of occurrence was extremely low (Table S6). Two additional low-conductance substates (S_1 and S_2) were also detected in higher amounts than the full conducting state O_1, which may correspond to a mixture of cross-linked species. These sbstates, however, were not further analyzed (Figure 3E). These data suggest that light-gated channels exhibit biophysical features of WT receptors activated by ATP.

Light-induced shrinking of TM2 ends, at least on two subunit interfaces, increases ATP function

We next addressed the contribution of the vertical shrinking of TM2 ends to the ATP response. We found that MAM cross-linking increased the time constants (τ) of ATP washout by two-fold from 0.580 ± 0.092 (n = 4, before treatment) to 1.062 ± 0.090 s (n = 7, after MAM treatment, Figure 4A). Noteworthy, toggling bound azobenzene in the *cis* state both increased maximal current by 1.4-fold (Figure 4B) and ATP sensitivity by 4-fold (n = 4 cells) (Figure 4C and Table S2) compared to the *trans* state. This demonstrates that the light-driven motions of the transmembrane pore are cooperatively

transmitted to the distant, extracellular ATP-binding sites.

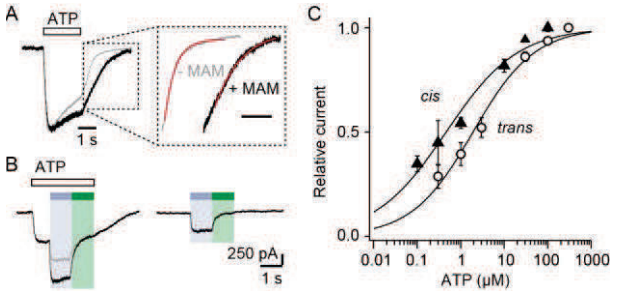


Figure 4. Vertical motions induced by *cis*-MAM at the I328C/S345C mutant increase ATP function. (A) Normalized whole-cell currents evoked by a saturating concentration of ATP (100 μM) recorded before (gray trace) and after (black trace) treatment with MAM. Inset highlights part of the currents upon ATP washout, fitted to single exponential decay functions (red traces). (B) Whole-cell light-gated currents recorded from the same cell in the presence (left) or absence (right) of ATP (100 μM). Gray trace indicates the predicted current if ATP-gated and light-gated currents at 365 nm were additive. (C) Concentration-response relationships for ATP at 525 nm (open circle, *trans* state) or in the dark immediately after illumination at 365 nm (filled triangle, *cis* state) (n = 4-8 cells; mean ± s.e.m.). Currents were normalized to 100 μM ATP at 365 nm and 300 μM ATP at 525 nm. The Hill equation was fit to the data.

To identify the minimal number of bound MAM that is necessary to open the pore, we designed concatenated cDNAs that encoded three joint P2X2-3T subunits, which had the I328C and/or S345C mutation(s) in one, two or three subunits (Figure S8A). All tested concatemers responded robustly to ATP and no apparent protein breakdown was detected by SDS-PAGE (Figure S8 B and D). Concatemers that allow MAM cross-linking at one of the three interfaces (denoted OO/CO/OC or OC/OO/CO, where C and O stands for cysteine mutation and wild-type residue, respectively) or within one subunit (intra helix cross-linking; OO/OO/CC) showed no light-gated currents (Figure S8A-C). However, a gradual increase of UV light-gated currents was observed for concatemers that allow MAM cross-linking at two and three interfaces (OC/CO/CC and CC/CC/CC, Figure S8A-C), demonstrating that two MAM molecules are sufficient to gate the channel. No or negligible light-gated currents were recorded in cells expressing concatemers harboring cysteine mutations in other combinations, as would be expected if there were alternative patterns of cross-linking (Figure S8A-C).

Models of both the closed and open channel states

To provide a structural interpretation of the light-gating experiments, we produced models incorporating MAM molecules in the *trans* and *cis* states starting with the apo and ATP-bound X-ray structures of the zfP2X4 receptor.[6]

Homologous cysteine mutations were introduced in the models (I336C and N353C equivalent to rP2X2 I328 and S345, respectively) and the resulting MAM-incorporating constructs were relaxed by short MD in explicit water and membrane. In both vertical and horizontal crosslinking, the structural restraints imposed by MAM had little effect on the closed state structure, compared to the crystal structure of the apo state (Figure 5A). In sharp contrast, the MD relaxation of the open state with MAM produced significant shrinking of the inter-subunit interface in the TMD, compared to the X-ray structure of the ATP-bound state, with the distance between the anchor points shortening from ~28 to ~24 Å upon horizontal cross-linking (from C_β of I336C) and from ~22 to ~17 Å upon vertical cross-linking (C_β of I336C and N353C, Figure 5B). This resulted in the disappearance of the large crevices seen in the X-ray structure (Figure 5D). Importantly, in simulations of the open state carried out without MAM, the channel rapidly collapsed, further stressing the critical roles of the structural constraints to stabilize the open channel form (Figure 5C).

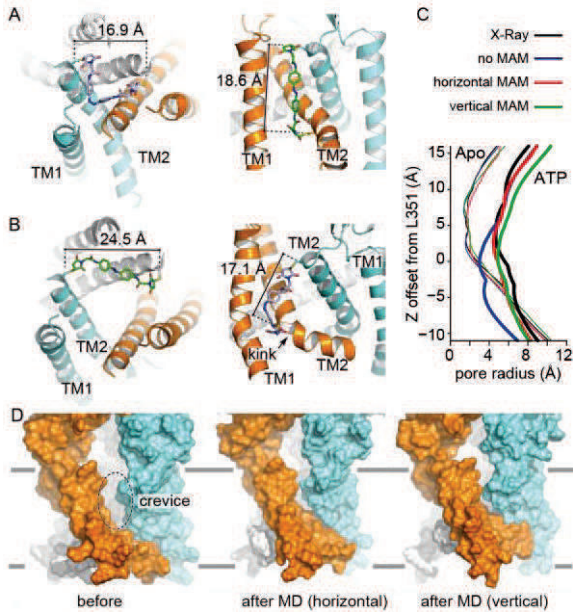


Figure 5. Molecular dynamics of zfP2X4 open channel state cross-linked by MAM reduce inter-subunit interface in the TMD. (A) Cartoon representation of the TMD of zfP2X4 receptor simulated in the closed state after MD, in which MAM (in stick) is conjugated horizontally between two I336C (*cis* configuration, left) or vertically between I336C and N353C (*trans* configuration, right). For clarity, only one MAM is shown vertically. Distances separating C_β atoms of engineered cysteines are 16.9 ± 0.5 Å (n = 800, mean ± s.d.) and 18.6 ± 0.9 Å (n = 2400). (B) Same views of the TMD simulated in the open state. Distances separating C_β atoms are 24.5 ± 0.6 Å (n = 800) and 17.1 ± 0.9 Å (n = 2400). TM1 and TM2 helices and the location of a kink in one of the three TM2 helices are also shown. (C) Transmembrane pore radius along the axis of the ion channel for the apo (thin lines) and ATP-bound (thick lines) states. The profiles were derived from the X-ray structures (black) or models obtained after MD relaxation computed with (red and green) or without MAM (blue) as indicated. In the absence of MAM, the open state rapidly closes in MD simulations near L351 (rP2X2: V343). (D) Lateral view of the channel displayed in surface

representation before (left) and after MD following MAM attachment between two I336C (middle) or between I336C and N353C (right).

Bending of TM2 at a critical glycine 'hinge' is essential for activation

Finally, our model of the open state trapped vertically by MAM predicted near its attachment site a striking kink in the middle of TM2 (Figure 5B). Although a similar kink has been previously described in X-ray structures[6] in proximity of a highly conserved glycine residue (zfP2X4 G350; rP2X2 G342), its functional role in channel opening remains unclear.[36,37] We hypothesized that bending of TM2 helices around this glycine would facilitate the inner and outer ends of adjacent TM2 helices to come closer together in the open state.

To test this assumption, we mutated this residue into proline (G342P), which is known to facilitate bending of alpha helices, and found a dramatic 25-fold increase in ATP sensitivity compared to the wild-type P2X2. Consistently, a 2.4-fold decrease of ATP sensitivity was observed for the G342A mutant (Figure 6A and B and Table S2). These data demonstrate that TM2 helices in the P2X2 receptor contain a critical glycine 'hinge', which facilitates their vertical bending, allowing their inner and outer ends of adjacent subunits to come closer during activation.

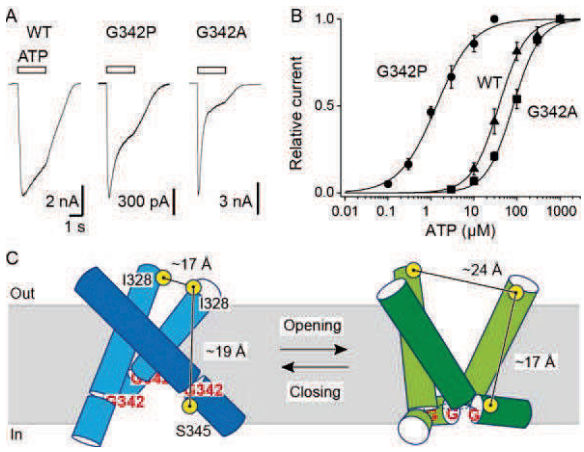


Figure. 6. Rearrangement of the pore-lining transmembrane helices during P2X activation. (A) Whole-cell currents evoked by ATP (at saturating concentrations) from HEK cells expressing the wild-type (WT) P2X2 receptor (1000 μM), G342P (100 μM) or G324A (1000 μM) mutant. (B) Concentration-response relationships for ATP at WT P2X2 receptor and mutant receptors, as indicated (n = 4-6 cells; mean ± s.e.m.). The Hill equation was fit to the normalized data. (C) Model of the P2X2 activation, in which a vertical shrinking of the inner and outer ends of adjacent TM2 helices, likely through bending at G342, is accompanied by a limited outward expansion of their outer ends. For clarity, TM1 helices are omitted, and TM2 are shown as three rods. The distances separating selected residues (yellow spheres) are derived from MD simulations.

Discussion

In this study we report the use of molecular photo-switchable tweezers in conjunction with MD simulations to explore the function of a trimeric ion channel. We show that vertical shrinking of the distance separating the inner and outer ends of adjacent pore-lining TM2 helices, likely through bending at a 'gating hinge', is essential for activation of the P2X2 receptor. Tethered molecular photo-switches have been already employed for the optical control of many receptors and ion channels,[38-41] including the trimeric acid-sensing ion channels (ASICs)[19] and ATP-gated P2X receptors,[19,28] mainly to get an optogenetic mimicry of neuronal signaling. They were also developed as biophysical tools to control conformational changes of peptides, proteins, or other biomolecules,[42,43] but probing activation or desensitization processes of ion channels using such photo-switches, remains limited.[19,44] The photo-switchable tweezers strategy presented here is therefore distinct from the optogating approach described previously,[28] and provides structural constraints related to channel gating at physiological conditions. Introducing them as input in MD allowed us to stabilize for the first time the open form of a P2X receptor in simulation. Interestingly, the emerging model differs substantially from the ATP-bound X-ray structure, particularly in the TMD.

By incorporating photo-switchable tweezers at engineered sites at the outer ends (horizontal cross-linking) or between the inner and outer ends (vertical cross-linking) of adjacent TM2 helices, we provide evidence that MAM molecule can be used as a molecular ruler to infer structural changes. It should be noted, however, that MAM behaves in solution not as a completely rigid cross-linker, especially for the *cis* isomer, which displayed a broad range of end-to-end distances. However, when cross-linked into proteins the distance distribution between the two maleimides is sharply defined, most likely due to steric constraints afforded by the protein itself (and the membrane in the present case). Thus, cross-linked MAM allows one to infer well-defined structural changes. In addition, we show that light-gated channels exhibit biophysical features of wild-type receptor activated by ATP, suggesting the discrete conformational states elicited by light closely resemble those populated by ATP. It remains to be determined whether or not the pathway that leads to channel opening and closing differs between light and ATP. Most importantly, light-induced motions in the TMD of the channel are shown to positively modulate ATP function, thus indicating an efficient crosstalk between the ion pore and the distant neurotransmitter-binding sites, a mechanism that is reminiscent of the action of positive allosteric modulators. Our approach thus offers a simple and unique strategy to probe directly in physiological conditions the large-scale functional motions of membrane-embedded proteins.

The first main finding of this study is a set of interatomic distances probed within the TMD both in the resting and the active state of the P2X2 receptor (Figure 6C). Our data confirm a lateral expansion of the extracellular portion of the TM helices [19], which was seen in the ATP-bound state.[6] Nonetheless, close scrutiny of the mean distances separating adjacent β-carbons of D57, Y47 and I328 residues measured in the ATP-bound X-ray structure

(~28 Å) shows that they are substantially larger than the end-to-end distance of *trans*-MAM (~24 Å). The same holds true for the vertical distance probed by *cis*-MAM between the β-carbons of I328 and S345 from adjacent subunits. Finally, no light-gated currents were recorded at P329C, a mutant for which the distance separating the β-carbons of two adjacent P329 (~23 Å) in the ATP-bound X-ray structure was expected to match the end-to-end distance of *trans*-MAM. Consistently, a shorter photo-switchable cross-linker, namely 4,4′-bis(maleimido)azobenzene (BMA), was recently shown to optically control the channel activity of this mutant.[19] All these structural constraints incorporated in the new models of the active state provide compelling evidence that the extent of the outward expansion is reduced by ~4 Å relative to the ATP-bound X-ray structure. As a direct consequence, the large inter-subunit crevices visualized in the crystals in the middle of the TMD[6] disappear, and the TMD becomes more tightly packed. The existence of these crevices represents a matter of controversy and a recent molecular modeling study has suggested that lipids can cross these gaps to block ion conduction.[24] Our data thus provide evidence that these crevices are likely artifacts in the X-ray structure, although we cannot rule out the possibility that lipids bind to these interfaces and modulate the ion-channel activity.[34]

Depending on the cross-linking location, MAM is able to trap (at least) two distinct open channel conformations, as evidenced by differences in desensitization kinetics and NMDG permeability. Although NMDG permeability was very low in one case (horizontal cross-linking) and partial in the other (vertical cross-linking), our data support the idea that the P2X pore fluctuates between distinct open conformations, and that these photo-switchable tweezers may be useful to investigate the controversy molecular mechanism of pore dilation.

The second main finding of this study is that the inner and outer ends of adjacent TM2 helices come closer in the open state, most likely through the vertical bending of these helices around G342 (Figure 6C). This highly conserved glycine residue was shown to be critically involved in ion pore dilation,[31] and a more recent work reported that a missense mutation at this position is associated with hereditary hearing loss in humans.[45] Noteworthy, a kink of the TM2 helices was reported in the ATP-bound crystal structure of zfP2X4 at G350,[6] a residue equivalent to G342 in the rP2X2. A similar kink is also evident in our model of the open state, although it appears to be located one turn below (near MAM attachment) in proximity of G344, another critical residue for gating.[46] Our data thus demonstrate that during activation the TM2 helices bend through a critical 'gating hinge', a mechanism that is reminiscent of the conformational change involved in K^+ channels gating.[47,48]

The emerging model of the open state trapped vertically by MAM is fully consistent with previous work.[21] In particular, it has been shown through engineering metal bridges that a Cd^{2+}-binding site involving V343C in all three subunits could form at the central axis of the pore. Our model shows that the side chains of the corresponding residue L351 in zfP2X4 receptor are indeed facing the ion pore lumen in close proximity to each other, a condition consistent with Cd^{2+} coordination.

Finally, we found that the vertical rearrangement of two TM2-TM2 interfaces is sufficient to drive channel gating, which is fully consistent with the recent finding that binding of two ATP molecules is sufficient to open the channel.[49] However, the situation is different for the lateral separation of the outer ends of TM2 helices, for which we (present study) and other[19] have shown that breaking of one TM2-TM2 interface is sufficient for gating. As there is no evidence that this movement alters the sensitivity for ATP, the light-induced outward expansion of a single TM2-TM2 interface is likely a local rearrangement of the TMD with no allosteric consequence.

In conclusion, this study provides the first application of photo-switchable derivatives to investigate the mechanism of pore gating in P2X receptors. The versatility of the strategy makes it a promising approach for dissecting the allosteric mechanism of membrane proteins in the broad sense.

Experimental procedures

Chemical synthesis. All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich, Acros Organics or Alfa Aesar in analytical grade. An Agilent MM-ESI-ACI-SQ MSD 1200 SL spectrometer or an Agilent LC-MS Agilent RRLC 1200SL/ESI QTof 6520 was used for ESI analysis. ^{1}H NMR and ^{13}C NMR were run at 400 and 100 MHz, respectively. Coupling constants (*J*) are quoted in Hz and chemical shifts (δ) are given in parts per million (ppm) using the residue solvent peaks as reference relative to TMS.

(*E*)-*N*,*N*′-(diazene-1,2-diylbis(4,1-phenylene))bis(2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetamide) (1)

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (1100 mg, 4.7 mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetic acid (730 mg, 4.7 mmol) (obtained as described[50]), 4-[(E)-2-(4-aminophenyl)diazen-1-yl]aniline (200 mg, 0.942 mmol) and diisopropylethylamine (0.800 ml, 4.7 mmol) in 10ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 20 hours under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*. The crude product was dissolved in a small volume of DMF and the product was precipitated using acetone. The precipitate was recovered by filtration, leading to the desired orange solid (252 mg, 0.518 mmol, 55%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 10.64 (s, 2H), 7.85 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz), 7.75 (d, 4H, *J* = 8.7 Hz), 7.16 (s, 4H), 4.33 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 170.62, 165.31, 148.83, 141.10, 134.95, 123.46, 119.42, 40.43; MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{24}H_{19}N_6O_6^+$ 487.1361, found, 487.1350.

(*E*)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamide (2)

N,N,N′,N′-Tetramethyl-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate (HBTU) (429 mg, 1.13

mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetic acid (177 mg, 1.13 mmol) (obtained as described[51]), 4-[(E)-2-(4-aminophenyl)diazen-1-yl]aniline (200 mg, 0.942 mmol) and diisopropylethylamine (0.192 ml, 1.13 mmol) in 10 ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 20 hours under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*, dissolved in AcOEt (150 ml), quenched with 150 ml of saturated $NaHCO_3$aq., then extracted with AcOEt (2 × 150 ml). The crude product was purified by column chromatography on silica (Heptane / EtOAc: 1/1 to 2/8 in vol.), resulting in the desired orange solid (221 mg, 0.63 mmol, 67%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ 10.47 (s, 1H), 7.73 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.68 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 7.62 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.65 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz), 6.03 (s, 2H), 4.24 (s, 2H), 2.75 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 177.14, 165.53, 152.47, 148.29, 142.82, 139.59, 124.82, 122.50, 119.41, 113.36, 41.12, 28.06; MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{18}H_{18}N_5O_3^+$ 352.1410, found, 352.1408.

(*E*)-2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)-*N*-(4-((4-(2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamido)phenyl)diazenyl)phenyl)acetamide (3)

1-[Bis(dimethylamino)methylene]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxid hexafluorophosphate (HATU) (380 mg, 0.62 mmol) was added to a solution of 2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetic acid (96 mg, 0.62 mmol) (obtained as described[50]), (*E*)-*N*-(4-((4-aminophenyl)diazenyl)phenyl)-2-(2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)acetamide (180 mg, 0.52 mmol) and diisopropylethylamine (0.105 ml, 0.62 mmol) in 10 ml of acetonitrile/DMF: 2/1. The reaction was carried out for 19 hours under argon atmosphere at room temperature. The solution was concentrated *in vacuo*, dissolved in AcOEt (150 ml), quenched with 150 ml of saturated $NaHCO_3$aq., then extracted with AcOEt (2 × 150 ml). The crude product was dissolved in a small volume of DMF and the product was precipitated using acetone. The precipitate was recovered by filtration, leading to the desired orange solid (486 mg, 0.31 mmol, 60%). ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): δ = 10.62 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 7.86 (d, 4H, *J* = 8,7 Hz), 7.75 (d, 4H, *J* = 8,7 Hz), 7.16 (s, 4H), 4.33 (s, 2H), 4.26 (s, 2H), 2.76 (s, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ = 177.80, 171.04, 165.75, 165.49, 148.24, 141.32, 135.26, 123.85, 119.91, 41.46, 40.79, 28.41; MS (ESI) (m/z): $[M+H]^+$ calcd. for $C_{24}H_{21}N_6O_6^+$ 489.1, found, 489.0.

MAM and MAS were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Euromedex) to make stock solutions (0.1-5 mM) and diluted in standard extracellular solution to 1-50 μM for labeling.

Molecular biology. Site-directed mutations were introduced into the rat P2X2 cDNA in the pcDNA3.1(+) using KAPA HiFi HotStart PCR kit (Cliniscience) as described previously [10]. All mutations were confirmed by DNA sequencing.

The wild-type trimeric P2X2 concatemer was obtained in three steps as described [52] and ligated into pcDNA3.1(+) vector. A C-terminal EE-epitope tag was also included in each subunit. To introduce mutations into the concatemer, each sequence encoding a monomer was cut from the concatemer at the according restriction sites and ligated into a shuttle vector. Site-directed mutagenesis was performed on the cDNA encoding individual subunit using QuikChange® II Site-directed mutagenesis kit (Stratagene), and confirmed by DNA sequencing. This product was then ligated back into the concatemer, and correct insertion was controlled by restriction enzyme digestion. The trimeric P2X2-3T concatemer was first obtained (OO/OO/OO), in which the three native cysteines (C9, C348 and C430) of each subunit were mutated to threonine.[20] Cysteine mutations at I328 and/or S345 were then introduced into this concatenated P2X2-3T background as indicated in Figure S8.

Gene expression in cultured cells. HEK-293 and TSA-201 cells were cultured and transiently transfected with the pcDNA3.1(+) vectors (0.05-2 μg) and a green fluorescent protein cDNA construct (0.3 μg) as previously described.[10]

Biochemistry. Cell-surface expression of concatemers was determined using the thiol-cleavable, membrane-impermeant reagent sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotin). TSA-201 cells were transfected with the pcDNA3.1(+) vectors containing the concatenated constructs (5 μg) and used 1day after. Cells were solubilized in lysis buffer and the supernatant was incubated overnight with neutravidin-agarose beads (Thermo Scientific) as previously described [10]. Protein samples were run on a 4–15% SDS-PAGE in Tris/Glycine/SDS running buffer (Bio-Rad). Samples were transferred to a nitrocellulose membrane as described,[10] which was then incubated in TPBS (PBS supplemented with 1% nonfat dry milk, 0.5% bovine serum albumin, and 0.05% Tween 20) containing a peroxidase-conjugated Glu-Glu Tag Rabbit Polyclonal antibody (EYMPME) for 2 h (dilution 1:5,000) at room temperature. Blots were developed with the ECLprime detection kit (GE Healthcare).

Cross-linking of cell-surface receptors was performed as follows. Adherent intact TSA-201 cells in dishes were incubated for 20 min under gentle agitation with 30 μM MAM in the presence of 3 μM ATP in ice-cold PBS containing 154 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 4.2 mM Na_2HPO_4, 1.47 mM KH_2PO_4, pH 7.0, supplemented with 1 mM $MgCl_2$ and 0.4 mM $CaCl_2$. Dishes were rapidly washed with PBS and incubated with Sulfo-NHS-SS-Biotin in PBS pH 8.0 as described above. The nitrocellulose membrane was incubated in TPBS buffer overnight at 4 °C with mouse anti-c-Myc antibody (Invitrogen) diluted at 1:2500. After three washes with TPBS, the blot was incubated with peroxidase-conjugated sheep anti-mouse antibody for 2 h (dilution 1:10,000; GE Healthcare) at room temperature and further washed three times with TPBS, and developed with the ECLprime detection kit (GE Healthcare).

Patch-clamp electrophysiology. Whole-cell recordings were performed 24-48 h after transfection. Before recordings, cells were incubated for 20 min with MAM (unless stated otherwise) or for 40 min with MAS in standard

extracellular solution (50 μM MAM for the horizontal screening, 1-15 μM MAM for the vertical screening, 1-15 μM MAS) and 3 μM ATP (to increase the accessibility of residues) in the dark at room temperature. After treatment, cells were extensively washed out. Patch pipettes (3–5 MΩ) contained 140 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. The standard extracellular solution contained 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM $MgCl_2$, 10 mM glucose, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH. All solutions were maintained approximately at 300 mOsm. Cells were voltage-clamped to -60 mV using the EPC10 (HEKA) amplifier and data were recorded with PATCHMASTER software.

For relative permeability measurements, an agar bridge containing 3 M KCl connected the bath and indifferent electrode. The intracellular solution comprised 147 mM NaCl, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH 7.3 with NaOH, or 140 mM CsCl, 5 mM MgCl2, 5 mM EGTA, 10 mM Hepes, adjusted to pH7.3 with CsOH. The standard extracellular solution was changed to symmetrical NaCl external solution and a voltage ramp pulse (from –120 to 80 mV; 165 ms duration) was applied. The solution was then exchanged with one of the following solutions, and another voltage ramp was applied: mannitol (Man) solution, sodium isethionate solution (Na-Ise), $CaCl_2$ (Ca) solution and *N*-methyl-D-glucamine (NMDG) solution. Composition of these solutions was described elsewhere[28] except for glucose, which was 10 mM. Voltage ramps were applied 300 ms after light switching. For light-gated currents, we calculated reversed potential (E_{rev}, mV) from voltage ramps after subtracting photocurrents to those recorded in the dark.

Single-channel recordings using outside-out configuration were carried out using HEK-293 cells at room temperature 24h after transfection. Recording pipettes pulled from borosilicate glass (Harvard Apparatus) were coated with Sylgard 184 (Dow Corning Co.) and fire polished to yield resistances of 6–20 MΩ. The holding potential was -120 mV. The extracellular solution contained 147 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Hepes, and 13 mM glucose, pH 7.3. The intracellular solution contained 147 mM NaF, 10 mM Hepes, and 10 mM EGTA, pH 7.3. Data were sampled at 4–10 kHz, and low-pass filtered at 2.9 kHz. For off-line analysis, data were refiltered to give a cascaded filter cutoff frequency of 1–2 kHz.[33]

Illumination of cells was achieved as described previously[28] with LEDs directly coupled to the microscope. The measured output intensities for wavelengths for 365 and 525 nm were, respectively, 8.1 and 4.1 mW/mm^2. Drug applications were carried out as described previously.[10]

Molecular modeling. Models of the P2X trimers with or without attached MAM photo-switchable tweezers were produced starting from the crystal structures of the zfP2X4 receptor in the apo, closed-channel (PDB id: 4DW0) and ATP-bound, open-channel (4DW1) states.[6] Unresolved side chains were modeled in CHARMM[53] as well as the missing terminal residues (modeled as α-helical extensions of TM1 and TM2) corresponding to the 28-365 residue range of the experimental truncated zfP2X4 construct.[6] The protonation state of the ionizable residues was accessed by pK_a calculations following the multiple-site titration approach based on continuum electrostatics.[54,55] The results obtained using APBS[56] and Karlsberg[57] indicated that all residues are in their standard protonation state at pH 7, independently of the ATP agonist. Cysteine residues were introduced at positions I336 (rP2X2: I328) or I336/N353 (S345) to incorporate the MAM molecule by fusing the reactive maleimide moieties with the thiol group of the engineered cysteines. All R/R, R/S, S/R, and S/S stereoisomers of the protein-fused MAM were treated simultaneously using four non-interacting copies[58] of the photo-switchable cross-linker. Either one horizontal (I336C/I336C) or three vertical (I336C/N353C) MAM molecules were incorporated in both the closed and the open-channel models. The protein trimers were then embedded in a pre-equilibrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-phosphatidylcholine (POPC) bilayer and fully solvated (including the open pore) with TIP3P[59] water molecules using VMD.[60] The net charge of the system was neutralized by adding a 150 mM equivalent of sodium and chloride ions. The resulting all-atom constructs (~138,000 atoms each) were modeled using the CHARMM force-field version 36,[61] with MAM parameters obtained from the CHARMM general force-field.[62]

The molecular systems were then subjected to energy minimization (5000 steps) followed by short MD equilibrations with periodic boundary conditions and Particle Mesh Ewald long-range electrostatics. Initial harmonic restraints were set for the positions of the protein C_α and C_β atoms (1.0 and 0.5 kcal/mol/$Å^2$, respectively, except for the TM2 helices, the cross-linked Cys residues, and the added terminal residues) and for the adenosine heavy atoms (1 kcal/mol/$Å^2$) of the ATP agonists. Following a short thermalization (600 ps), a 2-ns MD relaxation was performed in the NPT ensemble at 310 K and 1 atm with vanishing positional restraints. Because in the absence of MAM, the configuration of the open state captured in the crystal was intrinsically unstable in simulation, i.e., spontaneous shut of the ion pore within a few nanoseconds independently of the initial setup (equilibration procedure, protonation state of residues, membrane composition, etc.), additional distance restraints (1 kcal/mol/$Å^2$) between the residues N35, N353C, and C356 were introduced to incorporate structural information from recent Cd-binding essays at the intra-subunit TM1-TM2 interface.[24]

All MD simulations of P2X were performed using NAMD[63] version 2.10. Six independent 50 ns-long unrestrained MD simulations of the MAM molecule in solution (~10,000 atoms) were performed using ACEMD[64] in the NVT ensemble at 310 K for the *cis* and *trans* configurations and for the R/R, S/R, and S/S stereoisomers. Trajectories were analyzed using VMD and Wordom,[65] and molecular snapshots were rendered using PyMOL (Schrödinger, LLC). Profiles of the transmembrane pore radius

along the axis was calculated using the program HOLE[66] for backbone atoms only to emphasize global TM2 displacements. The mean distances between the S-S atoms (free MAM) obtained along the MD simulations were obtained by averaging over the R/R and S/S stereoisomers (25,000 snapshots each) and twice the R/S (resp. S/R) stereoisomer (2 × 25,000 snapshots) for a total of n = 100,000 for both the cis and trans configurations. The mean distances between the C-α-C-α of the cross-linked Cys residues were obtained for all four stereoisomers per MAM over the 200 snapshots saved along the 2 ns-long MD simulation, i.e., n = 800 or 2400 for one or three MAM molecule(s), respectively.

Data analysis. For data analyses, FitMaster (HEKA Electroniks, v2x69) and IGOR PRO (WaveMetrics, v6.32A) software were used. Experiments were repeated several times after, at least, two independent transfections. Data from dose-response relationships were fit to the Hill equation as described previously.[10] For determining ATP dose-response relationship for the I328C mutant at visible light, we subtracted $I_{(ATP+light)}$ from $I_{(light)}$, where $I_{(ATP+light)}$ is the maximal current evoked by ATP (at a given concentration) during light irradiation, $I_{(light)}$ is the maximal light-gated current recorded in the absence of ATP.

Increase of ATP maximal current was determined by the following equation: $(I_{(ATP+light)} - I_{(light)}) / I_{(ATP)}$, where $I_{(ATP+light)}$ is the maximal current evoked by a saturating concentration of ATP during light irradiation, and $I_{(ATP)}$ is the maximal current evoked by a saturating concentration of ATP in the dark. Apparent ATP desensitization of the I328C/S345C mutant was determined by calculating the ratio of the remaining current recorded just before the end of the ATP application and the peak current during the same application.

Fitting procedures to access the time constant were based on the single-exponential decay equation function: $I_t = I_o + A \exp(-t/\tau)$, where I_o and A are the residual current and maximal amplitude, respectively, t is the time in seconds, and τ is the time constant in seconds.

Channel events were detected by using TAC software (Bruxton Co.) and conductance levels were measured by all-points amplitude histograms fit to Gaussian distributions. For relative permeability measurements, values of E_{rev} were corrected for liquid junction potentials, which were calculated using IGOR PRO, and used to determine the permeability ratios ($P_X/P_{cations}$) as described previously.[28]

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information . Experimental procedures, detailed description of the synthesis of MAM and MAS, detailed description of molecular modeling, and additional Figures (Figure S1-S8). This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*grutter@unistra.fr.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENT

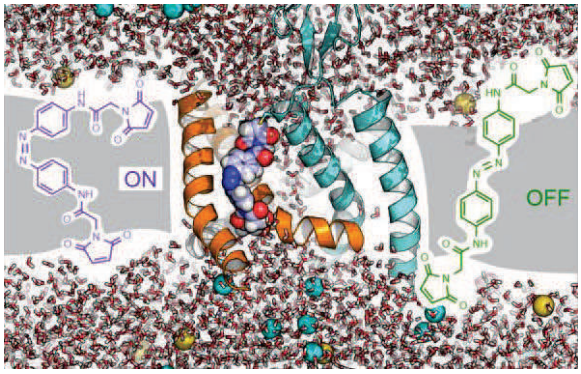
The authors thank Pr. M. Goeldner for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the International Center for Frontier Research in Chemistry (icFRC) and grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-001-01 and ANR-11-BSV5-001-02). This work was granted access to the HPC resources of [CCRT/CINES/IDRIS] under the allocation 2014-[076644] made by GENCI (Grand Equipement National de Calcul Intensif). We acknowledge the Partnership for Advanced Computing in Europe (PRACE) for awarding us access to resources at the SuperMUC center in Leibniz (Germany). HPC resources from the Mesocentre at the University of Strasbourg are also acknowledged. C.H. was supported by a doctoral fellowship from the icFRC (CONV/2011/01/CIRFR-N°157). D.L. was supported by a postdoctoral fellowship from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV5-001-01). N.C. received support from IdEx Projet Interdisciplinaire (Grant No. RIDEX04).

REFERENCES

(1) Khakh, B. S.; North, R. A. Nature 2006, 442, 527.
(2) Jiang, R.; Taly, A.; Grutter, T. Trends in biochemical sciences 2013, 38, 20.
(3) Browne, L. E.; Jiang, L. H.; North, R. A. Trends in pharmacological sciences 2010, 31, 229.
(4) Abbracchio, M. P.; Burnstock, G.; Verkhratsky, A.; Zimmermann, H. Trends Neurosci 2009, 32, 19.
(5) Kawate, T.; Michel, J. C.; Birdsong, W. T.; Gouaux, E. Nature 2009, 460, 592.
(6) Hattori, M.; Gouaux, E. Nature 2012, 485, 207.
(7) Jiang, L. H.; Kim, M.; Spelta, V.; Bo, X.; Surprenant, A.; North, R. A. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 2003, 23, 8903.
(8) Nagaya, N.; Tittle, R. K.; Saar, N.; Dellal, S. S.; Hume, R. I. J Biol Chem 2005, 280, 25982.
(9) Marquez-Klaka, B.; Rettinger, J.; Bhargava, Y.; Eisele, T.; Nicke, A. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience 2007, 27, 1456.
(10) Jiang, R.; Martz, A.; Gonin, S.; Taly, A.; de Carvalho, L. P.; Grutter, T. The Journal of biological chemistry 2010, 285, 15805.
(11) Jiang, R.; Taly, A.; Lemoine, D.; Martz, A.; Cunrath, O.; Grutter, T. The EMBO journal 2012, 31, 2134.
(12) Du, J.; Dong, H.; Zhou, H. X. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 4140.
(13) Lorinczi, E.; Bhargava, Y.; Marino, S. F.; Taly, A.; Kaczmarek-Hajek, K.; Barrantes-Freer, A.; Dutertre, S.; Grutter, T.; Rettinger, J.; Nicke, A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 11396.
(14) Roberts, J. A.; Allsopp, R. C.; El Ajouz, S.; Vial, C.; Schmid, R.; Young, M. T.; Evans, R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2012, 109, 4663.
(15) Hausmann, R.; Gunther, J.; Kless, A.; Kuhlmann, D.; Kassack, M. U.; Bahrenberg, G.; Markwardt, F.; Schmalzing, G. Molecular pharmacology 2013, 83, 73.
(16) Zhao, W. S.; Wang, J.; Ma, X. J.; Yang, Y.; Liu, Y.; Huang, L. D.; Fan, Y. Z.; Cheng, X. Y.; Chen, H. Z.; Wang, R.; Yu, Y. Nature communications 2014, 5, 4189.
(17) Huang, L. D.; Fan, Y. Z.; Tian, Y.; Yang, Y.; Liu, Y.; Wang, J.; Zhao, W. S.; Zhou, W. C.; Cheng, X. Y.; Cao, P.; Lu, X. Y.; Yu, Y. PloS one 2014, 9, e97528.
(18) Stelmashenko, O.; Compan, V.; Browne, L. E.; North, R. A. J Biol Chem 2014, 289, 9909.

(19) Browne, L. E.; Nunes, J. P.; Sim, J. A.; Chudasama, V.; Bragg, L.; Caddick, S.; North, R. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111*, 521.
(20) Li, M.; Chang, T. H.; Silberberg, S. D.; Swartz, K. J. *Nature neuroscience* **2008**, *11*, 883.
(21) Li, M.; Kawate, T.; Silberberg, S. D.; Swartz, K. J. *Nat. Commun.* **2010**, *1*, 44.
(22) Kracun, S.; Chaptal, V.; Abramson, J.; Khakh, B. S. *The Journal of biological chemistry* **2010**, *285*, 10110.
(23) Samways, D. S.; Li, Z.; Egan, T. M. *Frontiers in cellular neuroscience* **2014**, *8*, 6.
(24) Heymann, G.; Dai, J.; Li, M.; Silberberg, S. D.; Zhou, H. X.; Swartz, K. J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, E4045.
(25) Chaumont, S.; Jiang, L. H.; Penna, A.; North, R. A.; Rassendren, F. *The Journal of biological chemistry* **2004**, *279*, 29628.
(26) Allsopp, R. C.; Evans, R. J. *The Journal of biological chemistry* **2011**, *286*, 44691.
(27) Robinson, L. E.; Murrell-Lagnado, R. D. *Frontiers in cellular neuroscience* **2013**, *7*, 233.
(28) Lemoine, D.; Habermacher, C.; Martz, A.; Mery, P. F.; Bouquier, N.; Diverchy, F.; Taly, A.; Rassendren, F.; Specht, A.; Grutter, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110*, 20813.
(29) Trujillo, C. A.; Nery, A. A.; Martins, A. H.; Majumder, P.; Gonzalez, F. A.; Ulrich, H. *Biochemistry* **2006**, *45*, 224.
(30) Virginio, C.; MacKenzie, A.; Rassendren, F. A.; North, R. A.; Surprenant, A. *Nature neuroscience* **1999**, *2*, 315.
(31) Khakh, B. S.; Bao, X. R.; Labarca, C.; Lester, H. A. *Nature neuroscience* **1999**, *2*, 322.
(32) Rokic, M. B.; Stojilkovic, S. S. *Frontiers in cellular neuroscience* **2013**, *7*, 215.
(33) Jiang, R.; Lemoine, D.; Martz, A.; Taly, A.; Gonin, S.; Prado de Carvalho, L.; Specht, A.; Grutter, T. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, *108*, 9066.
(34) Rothwell, S. W.; Stansfeld, P. J.; Bragg, L.; Verkhratsky, A.; North, R. A. *J Biol Chem* **2014**, *289*, 618.
(35) Ding, S.; Sachs, F. *The Journal of general physiology* **1999**, *113*, 695.
(36) Li, Z.; Migita, K.; Samways, D. S.; Voigt, M. M.; Egan, T. M. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2004**, *24*, 7378.
(37) Khakh, B. S.; North, R. A. *Neuron* **2012**, *76*, 51.
(38) Volgraf, M.; Gorostiza, P.; Numano, R.; Kramer, R. H.; Isacoff, E. Y.; Trauner, D. *Nature chemical biology* **2006**, *2*, 47.
(39) Tochitsky, I.; Banghart, M. R.; Mourot, A.; Yao, J. Z.; Gaub, B.; Kramer, R. H.; Trauner, D. *Nature chemistry* **2012**, *4*, 105.
(40) Levitz, J.; Pantoja, C.; Gaub, B.; Janovjak, H.; Reiner, A.; Hoagland, A.; Schoppik, D.; Kane, B.; Stawski, P.; Schier, A. F.; Trauner, D.; Isacoff, E. Y. *Nature neuroscience* **2013**, *16*, 507.
(41) Fehrentz, T.; Schonberger, M.; Trauner, D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2011**, *50*, 12156.
(42) Beharry, A. A.; Woolley, G. A. *Chemical Society reviews* **2011**, *40*, 4422.
(43) Szymanski, W.; Beierle, J. M.; Kistemaker, H. A.; Velema, W. A.; Feringa, B. L. *Chemical reviews* **2013**, *113*, 6114.
(44) Reiner, A.; Isacoff, E. Y. *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 273.
(45) Faletra, F.; Girotto, G.; D'Adamo, A. P.; Vozzi, D.; Morgan, A.; Gasparini, P. *Gene* **2014**, *534*, 236.
(46) Fujiwara, Y.; Keceli, B.; Nakajo, K.; Kubo, Y. *The Journal of general physiology* **2009**, *133*, 93.
(47) del Camino, D.; Yellen, G. *Neuron* **2001**, *32*, 649.
(48) Jiang, Y.; Lee, A.; Chen, J.; Cadene, M.; Chait, B. T.; MacKinnon, R. *Nature* **2002**, *417*, 523.
(49) Stelmashenko, O.; Lalo, U.; Yang, Y.; Bragg, L.; North, R. A.; Compan, V. *Molecular pharmacology* **2012**, *82*, 760.
(50) Allen, V. C.; Robertson, C. C.; Turega, S. M.; Philp, D. *Organic letters* **2010**, *12*, 1920.
(51) Bansode, T. N.; Shelke, J. V.; Dongre, V. G. *European journal of medicinal chemistry* **2009**, *44*, 5094.
(52) Browne, L. E.; Cao, L.; Broomhead, H. E.; Bragg, L.; Wilkinson, W. J.; North, R. A. *Nat Neurosci* **2011**, *14*, 17.
(53) Brooks, B. R.; Brooks, C. L., 3rd; Mackerell, A. D., Jr.; Nilsson, L.; Petrella, R. J.; Roux, B.; Won, Y.; Archontis, G.; Bartels, C.; Boresch, S.; Caflisch, A.; Caves, L.; Cui, Q.; Dinner, A. R.; Feig, M.; Fischer, S.; Gao, J.; Hodoscek, M.; Im, W.; Kuczera, K.; Lazaridis, T.; Ma, J.; Ovchinnikov, V.; Paci, E.; Pastor, R. W.; Post, C. B.; Pu, J. Z.; Schaefer, M.; Tidor, B.; Venable, R. M.; Woodcock, H. L.; Wu, X.; Yang, W.; York, D. M.; Karplus, M. *Journal of computational chemistry* **2009**, *30*, 1545.
(54) Bashford, D.; Karplus, M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 10219.
(55) Bashford, D.; Karplus, M. *J Phys Chem-Us* **1991**, *95*, 9556.
(56) Baker, N. A.; Sept, D.; Joseph, S.; Holst, M. J.; McCammon, J. A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2001**, *98*, 10037.
(57) Rabenstein, B.; Knapp, E. W. *Biophysical journal* **2001**, *80*, 1141.
(58) Roitberg, A.; Elber, R. *J Chem Phys* **1991**, *95*, 9277.
(59) Durell, S. R.; Brooks, B. R.; Bennaim, A. *J Phys Chem-Us* **1994**, *98*, 2198.
(60) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *Journal of molecular graphics* **1996**, *14*, 33.
(61) Best, R. B.; Zhu, X.; Shim, J.; Lopes, P. E.; Mittal, J.; Feig, M.; Mackerell, A. D., Jr. *Journal of chemical theory and computation* **2012**, *8*, 3257.
(62) Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell, A. D., Jr. *Journal of computational chemistry* **2010**, *31*, 671.
(63) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kale, L.; Schulten, K. *Journal of computational chemistry* **2005**, *26*, 1781.
(64) Harvey, M. J.; Giupponi, G.; De Fabritiis, G. *Journal of chemical theory and computation* **2009**, *5*, 1632.
(65) Seeber, M.; Cecchini, M.; Rao, F.; Settanni, G.; Caflisch, A. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2625.
(66) Smart, O. S.; Neduvelil, J. G.; Wang, X.; Wallace, B. A.; Sansom, M. S. *Journal of molecular graphics* **1996**, *14*, 354.

TOC graphic



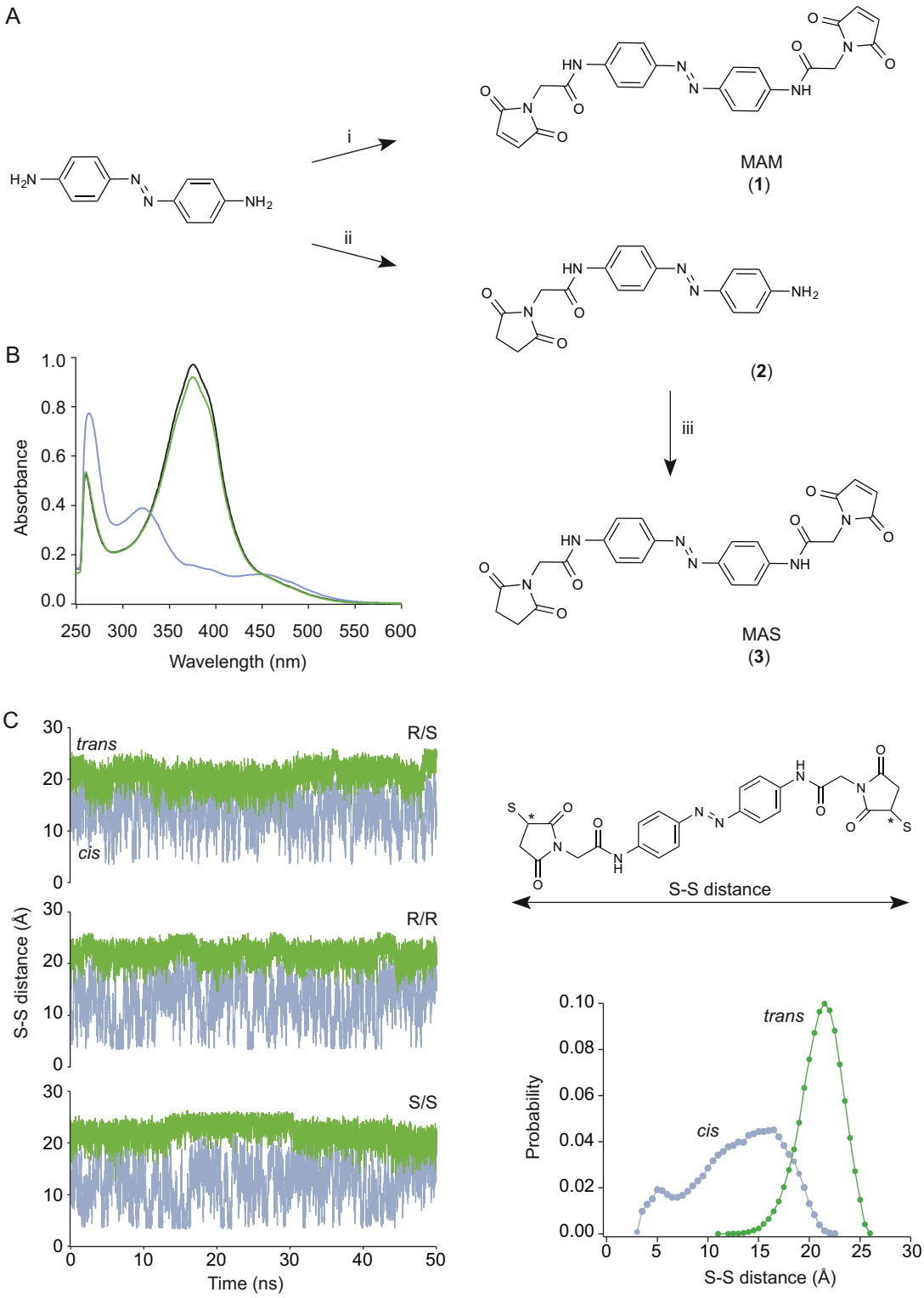


Fig. S1. Chemical synthesis and physico-chemical properties of azobenzene derivatives. (A) Synthesis of MAM and MAS; i) HATU, DIEA, 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl)acetic acid, ACN/DMF, 19h, RT, ρ = 55%; ii) TBTU, Et_3N, 2-(2,5-dioxopyrrolidium-1-yl)acetic acid, ACN/DMF, 19h, RT, ρ = 27%; iii) HATU, DIEA, 2-(2,5-dioxo-2,5-dihydro-1H-pyrrol-1-yl)acetic acid, ACN/DMF, 19h, RT, ρ = 60%. (B) UV/visible spectrum of MAM (30 μM) in DMSO in the dark (black trace), after illumination at 365 nm (violet trace) and subsequently at 525 nm (green trace). (C) Left, time series of the end-to-end distance of free MAM in bulk water determined from six 50 ns-long MD simulations in either *cis* (violet) or *trans* configuration (green). Shown is the S-S distance computed from two sulfur atoms of the three stereoisomers (R/S, R/R and S/S) following reaction with maleimides as shown in the top right. Asteriks indicate stereocenters. Bottom right, corresponding normalized probability distributions averaged from the three time series.

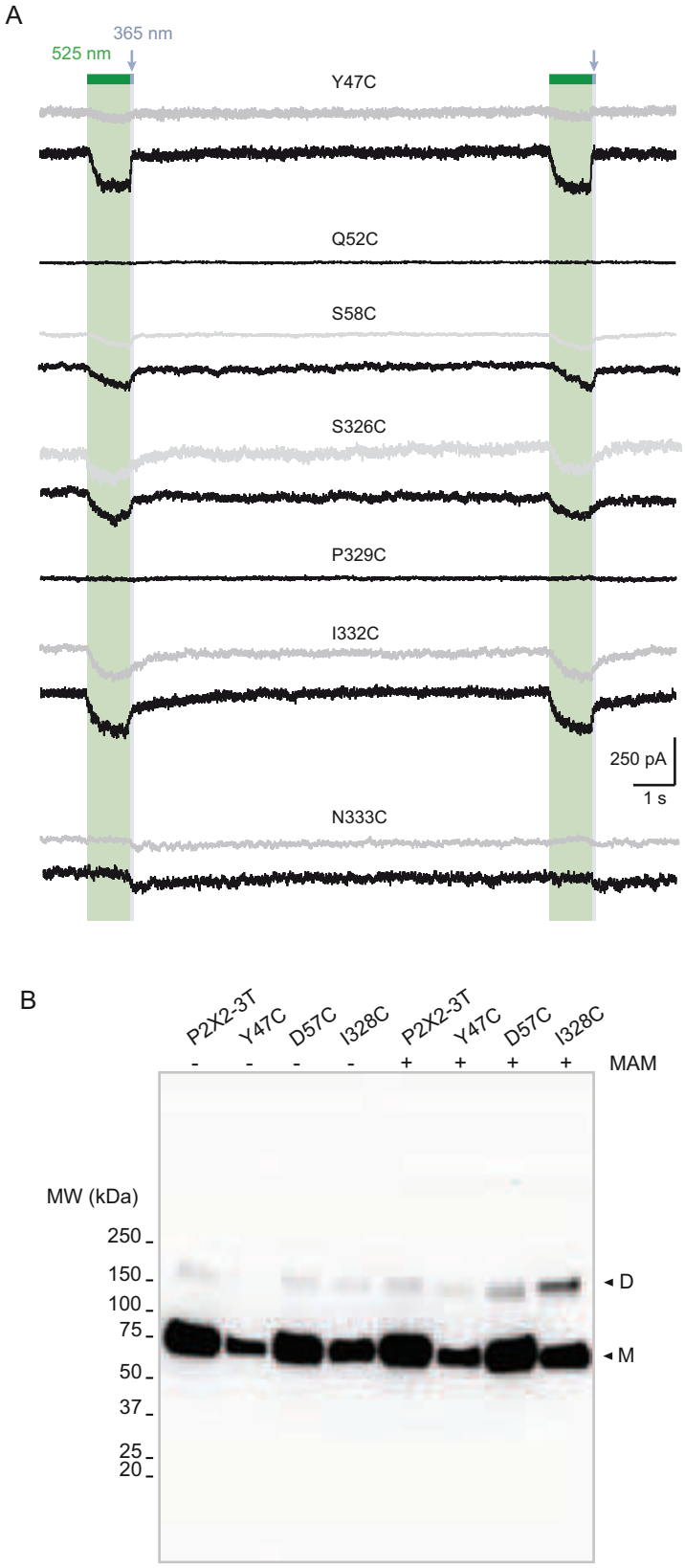


Fig. S2. Horizontal screening confirms an outward expansion of the TM helices. (A) Whole-cell currents evoked by light at the indicated wavelengths in cells expressing the indicated cysteine-substituted mutants after treatment with MAM (black traces) or MAS (grey traces). Just before recordings, cells were briefly irradiated with a light pulse of 365 nm, except for N333C mutant. (B) Uncut gel image of cross-linked P2X2-3T subunits from Figure 1e.

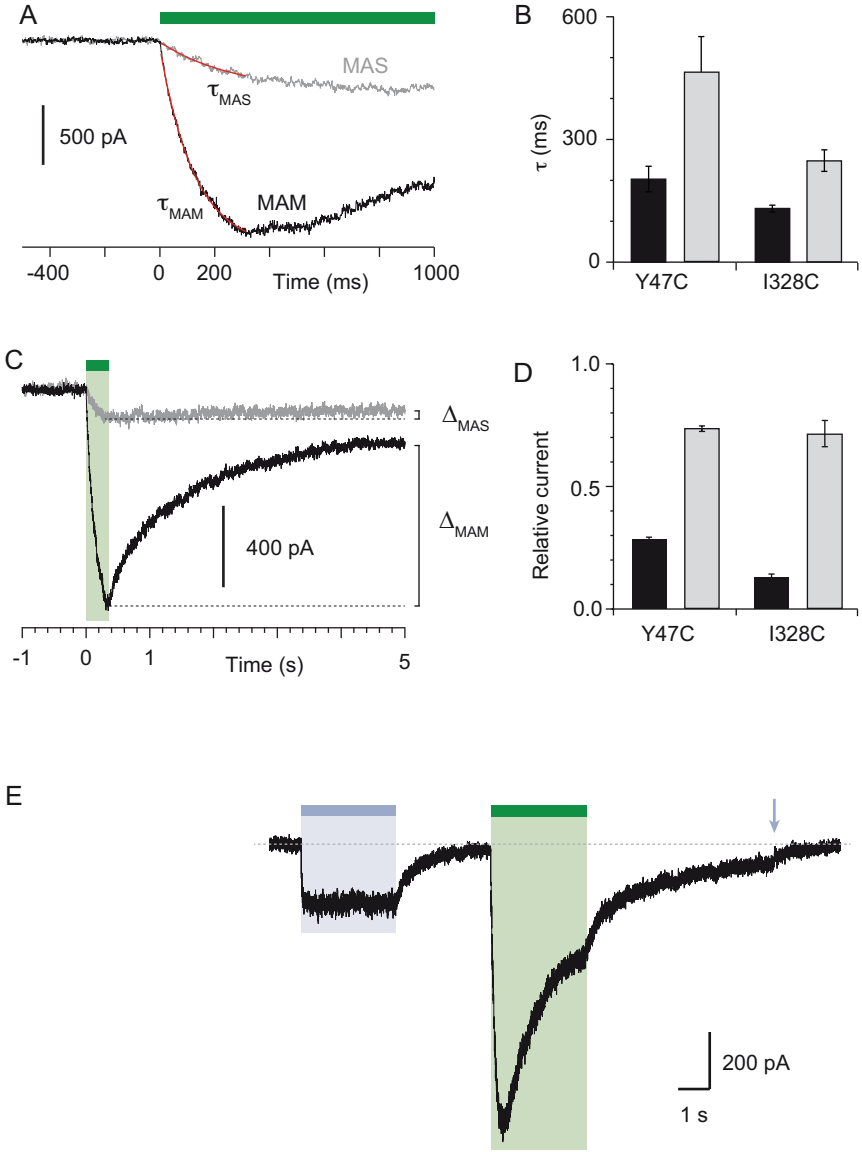


Fig. S3. Characterization of currents induced by the isomerization of azobenzene compounds attached at the I328C or Y47C mutant. (A) Light-induced whole-cell currents in I328C mutant treated with MAS (grey trace) or MAM (black trace). Just before recording, cells were irradiated with a light pulse of 365 nm. Data were fit with a single exponential function (red traces) giving the time constant (τ) of receptor activation. (B) Bar plot showing time constants of activation during illumination at 525 nm for Y47C and I328C receptors treated with MAS (grey bars) or MAM (black bars) (n = 4-8 cells; mean ± s.e.m.). (C) Light-induced whole-cell currents in I328C mutant treated by MAS (grey trace) or MAM (black trace) shown on a different time scale. ΔMAS and ΔMAS indicate current stability, which was defined as the ratio of currents measured 5 s after 525 nm illumination and currents measured at the peak. (D) Bar plot showing the current stability for Y47C or I328C mutant treated with MAS (grey bars) or MAM (black bars) (n = 4-8 cells; mean ± s.e.m.). (E) Whole-cell current evoked by 365 nm and 525 nm illumination recorded from a cell expressing the I328C mutant. Before recording, the cell was briefly irradiated at 365 nm.

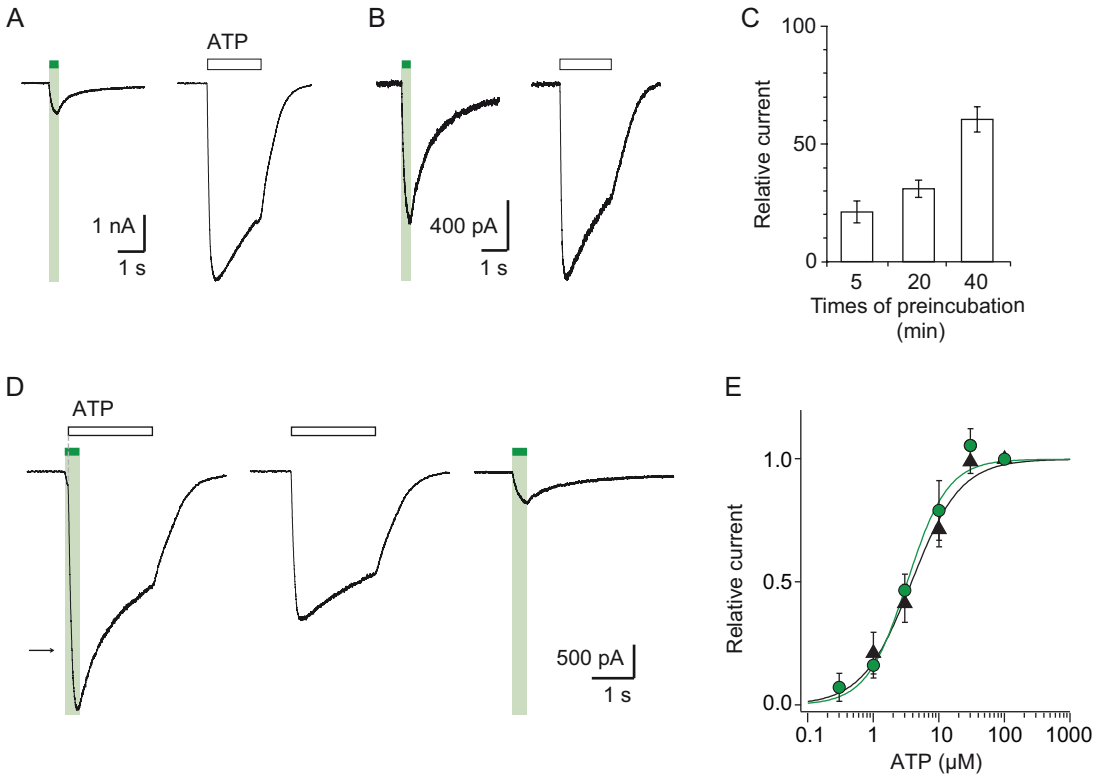


Fig. S4. Kinetics of MAM labeling and effect of light on ATP currents in cells expressing the I328C mutant. Whole-cell currents evoked by illumination at 525 nm light or by a saturating concentration of ATP (100 μM) recorded from the same cells that were preincubated with MAM for 5 (A) or 40 minutes (B). (C) Bar plot showing the relative current defined as the ratio of light-gated currents to ATP-gated currents for different times of MAM preincubation (n = 7-9 cells). (D) Left, whole-cell current evoked by a saturating concentration of ATP (100 μM) is potentiated by a short (350 ms) visible light irradiation that slightly precedes ATP application. Control currents evoked by 100 μM ATP (middle) or 525 nm light irradiation alone (right) are shown from the same cell. Preincubation time with MAM was 20 minutes. The arrow indicates the predicted current if ATP-gated and light-gated currents at 525 nm were additive. (E) Concentration-response relationships for ATP at 525 nm (green circles, time irradiation: 350 ms) or in the dark after illumination at 365 nm (filled triangles) from cells treated with MAM for 20 minutes (n = 4 cells; mean ± s.e.m.). Currents were normalized to 100 μM ATP. The Hill equation was fit to the data.

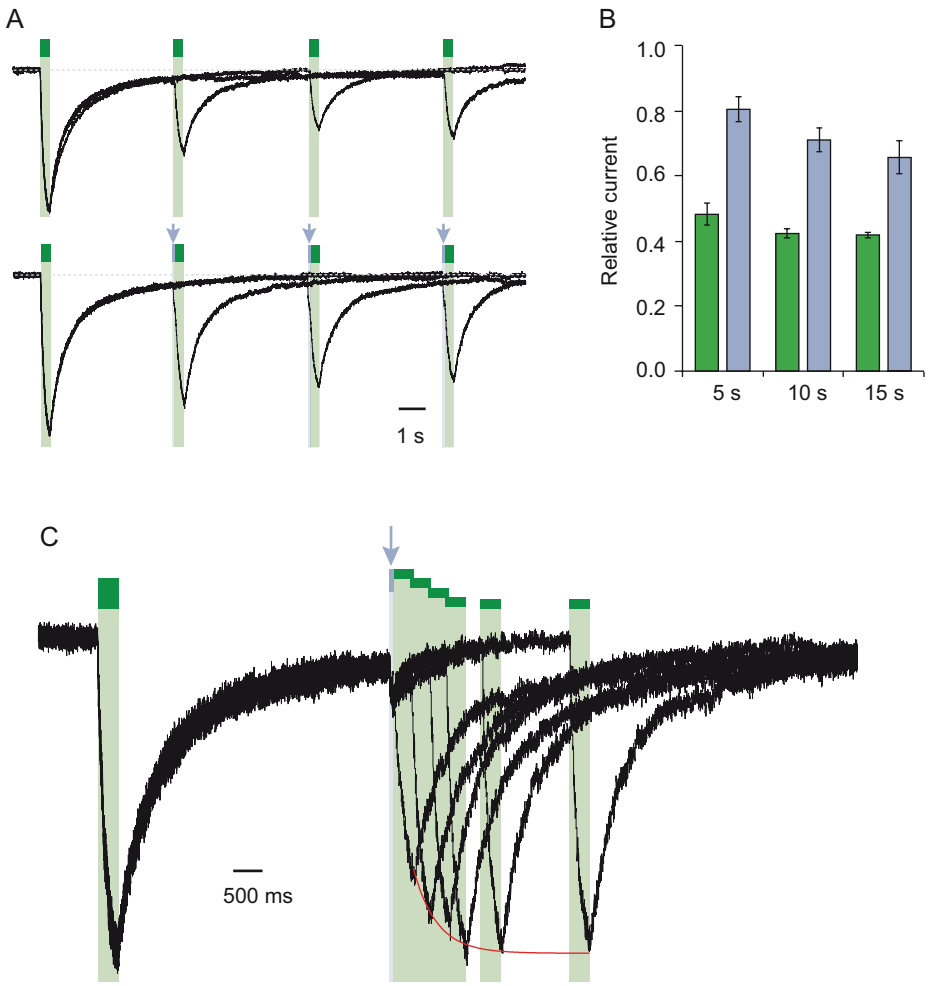


Fig. S5. Exploration of desensitization and resensitization of the I328C mutant treated with MAM. (A) Superimposed light-gated currents from the same cell desensitize as monitored by subsequent activation at different waiting times (upper panel). Desensitization was less pronounced if a very short pulse of UV light (80 ms) is delivered just before activation (indicated by arrows, bottom panel). In each case, cells were briefly shone at 365 nm before recordings to resensitize receptors. (B) Bar plot showing the ratio of maximal current recorded in the second to first irradiation with (violet bars) or without (green bars) the short pulse at 365 nm (n = 4 cells; mean ± s.e.m.) at different waiting times. (C) Superimposed light-gated currents from the same cell slowly recover from desensitization after a short UV light (arrow) as monitored by subsequent activations performed at different times. The red line depicts the recovery time course (τ = 396 ± 27 ms, n = 3).

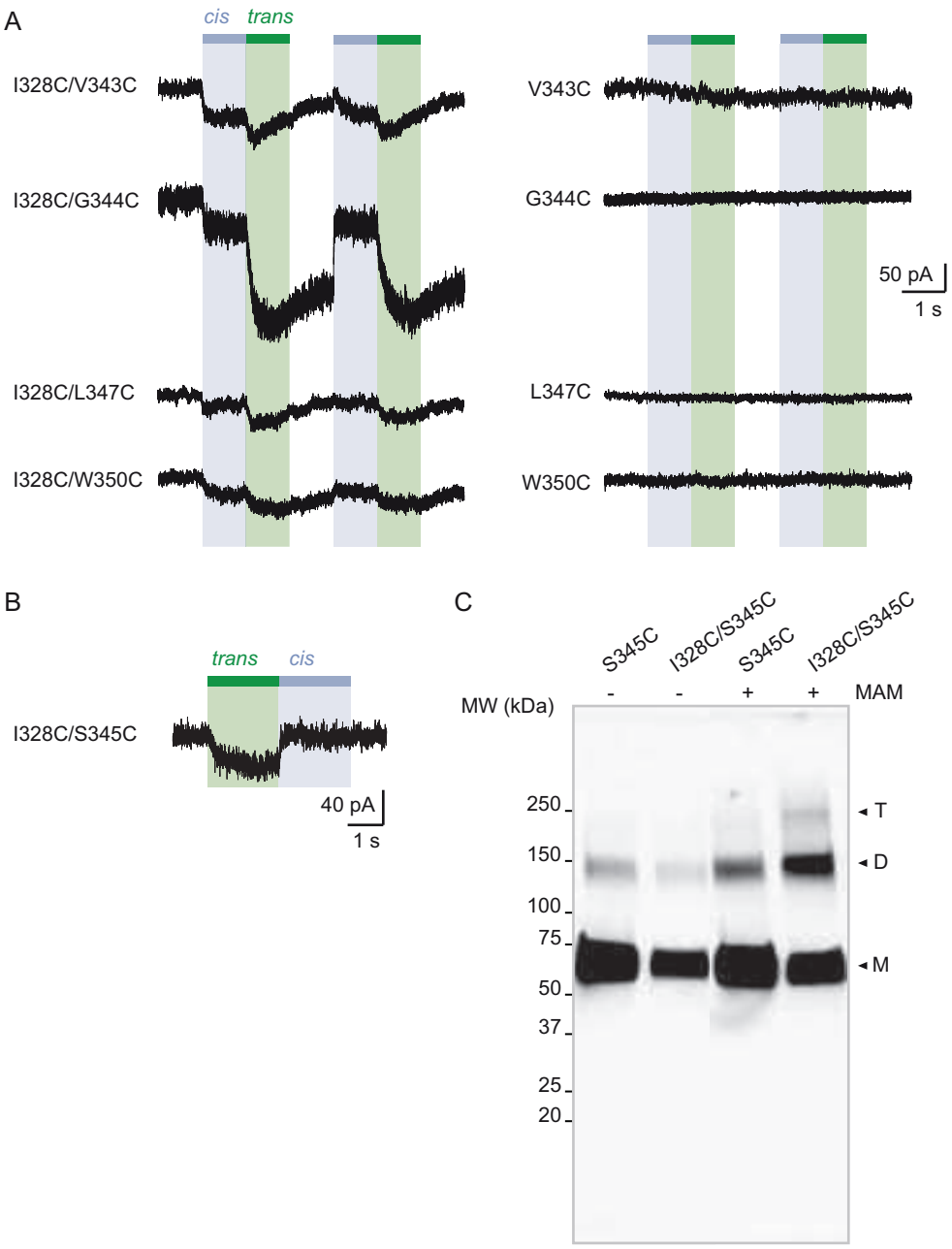


Fig. S6. Vertical screening identifies a shortening of the distance separating ajdacent TM2 ends during activation. (A) Whole-cell currents evoked by light at 365 nm (*cis*) or 525 nm (*trans*) in cells expressing the indicated cysteine-substituted mutants treated with MAM. (B) Whole-cell current evoked by light at 525 nm (*trans*) in a cell expressing the indicated cysteine-substituted mutant treated with MAS. (C) Uncut gel image of cross-linked P2X2-3T subunits from Figure 3b.

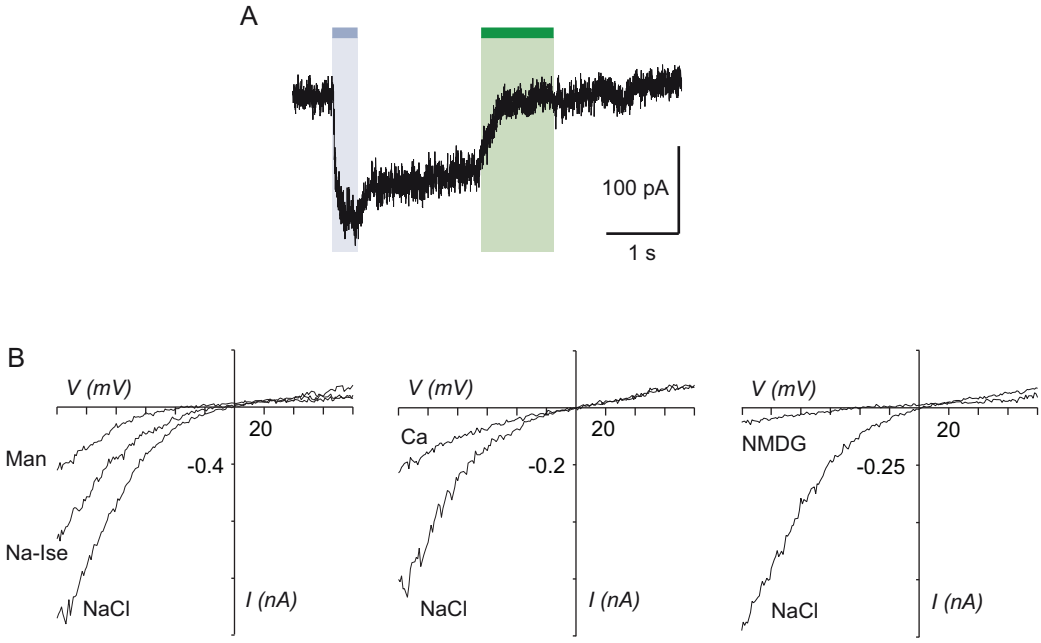


Fig. S7. Biophysical properties of the I328C/S345C mutant. (A) Whole-cell current recorded in the dark after illumination at 365 nm and 525 nm in a cell expressing the I328C/S345C mutant. (B) Current-voltage curves recorded in different extracellular solutions (Man, mannitol; Na-Ise, sodium isethionate; Ca, calcium, NaCl, symmetrical NaCl external solution). Light-gated currents were obtained after subtracting photocurrents recorded at 365 nm light to those obtained in the dark after switching to 525 nm light.

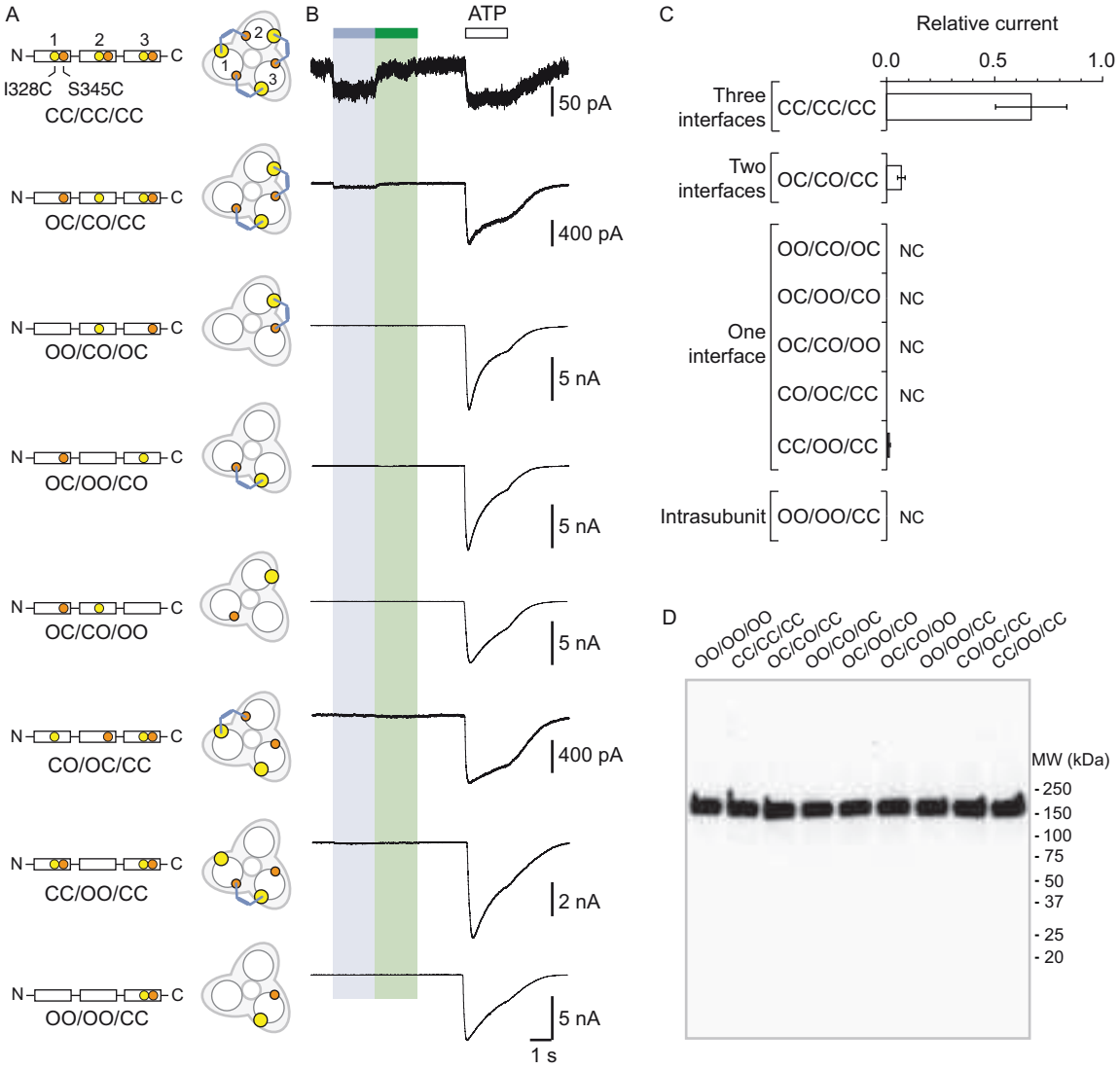


Fig. S8. Concatenated P2X2-3T receptors are gated by UV light with only two cross-linked MAM. (A) Schematic representation of the trimeric P2X2-3T concatemers containing a wild-type subunit and/or a mutated subunit at I328 (yellow spheres) and/or at S345 (orange spheres). C and O indicate cysteine mutation and wild-type residue, respectively. The expected locations of *cis*-MAM cross-linking (colored stick) within the concatenated trimeric receptor are also indicated. (B) Whole-cell currents recorded from TSA-201 cells expressing the concatenated trimeric P2X2-3T receptors (indicated in panel a) following light switching and ATP application (100 μM, saturating as determined from controls in which current amplitudes evoked by 300 μM ATP were similar to those evoked by 100 μM ATP). Actual light-gated current amplitudes were 3.0 ± 1.5 for CC/CC/CC and 3.8 ± 1.5 pA/pF for OC/CO/CC (n = 4-6 cells). (C) Bar plot summarizing the ratio between light (365 nm)-gated currents and ATP-gated currents (n = 4-6 cells; mean ± s.e.m.) for the indicated concatemers. NC stands for no current. (D) Western blot analysis from SDS/PAGE of concatenated P2X2-T receptors shows the presence of a predominant protein expressed at the surface of TSA-201 cells that had a molecular weight corresponding to that of a trimer. Concatemer that contained wild-type residues in the first, second and third subunits is depicted OO/OO/OO. MW, Molecular weight.

Table S1. Interatomic distances between pairwise residues

Pairwise residues	Relative distances in apo state (Å)	Relative distances in the ATP-bound state (Å)
Y47… Y47	26.6 ± 0.1	28.3 ± 0.5
V48 … V48	18.6 ± 0.2	22.8 ± 0.4
Q52 … Q52	20.9 ± 0.1	24.0 ± 0.2
D57 … D57	15.1 ± 0.0	26.6 ± 0.3
S58 … S58	13.3 ± 0.1	20.0 ± 0.2
S326 … S326	19.9 ± 0.1	31.0 ± 0.2
I328 … I328	16.1 ± 0.1	27.6 ± 0.4
P329 … P329	12.0 ± 0.2	23.4 ± 0.4
I332 … I332	7.2 ± 0.2	19.4 ± 0.2
N333 … N333	11.3 ± 0.3	20.8 ± 0.2
I328 … V343	15.6 ± 0.2	18.9 ± 0.2
I328 … G344	16.0 ± 0.2	18.5 ± 0.2
I328 … S345	20.5 ± 0.2	23.2 ± 0.2
I328 … F346	20.9 ± 0.1	23.1 ± 0.3
I328 … L347	17.5 ± 0.2	18.8 ± 0.3
I328 … C348	19.9 ± 0.4	22.2 ± 0.3
I328 … D349	24.4 ± 0.3	25.9 ± 0.3
I328 … W350	23.9 ± 0.2	22.2 ± 0.3

Values (means ± s.e.m.) are the average distances separating the side chain β-atoms (C_β…. C_β) of indicated residues from all three subunits of P2X2 homology models built from X-ray structures of the zfP2X4 receptor (6). For G344, the C_α was selected.

Table S2. Estimated EC_{50} and Hill coefficients for ATP activation

Constructs	ATP EC_{50} (μM)	n_H
rP2X2-3T	19.3 ± 2.6	1.4 ± 0.1
Y47C[1]	2.5 ± 0.9	1.1 ± 0.1
V48C[1]	9.4 ± 4.7	1.6 ± 0.0
Q52C[1]	93.9 ± 13.8	1.7 ± 0.1
D57C	15.2 ± 2.9	1.2 ± 0.1
S58C	18.3 ± 1.4	1.5 ± 0.2
S326C	16.5 ± 3.4	1.3 ± 0.2
I328C[1]	5.1 ± 0.9	1.3 ± 0.1
P329C[1]	7. ± 1.0	0.9 ± 0.1
I332C[1]	9.6 ± 3.0	1.0 ± 0.1
N333C[1]	9.2 ± 4.2	2.2 ± 1.0
V343C	32.3 ± 9.0	1.1 ± 0.1
G344C	73.5 ± 10.7	1.2 ± 0.1
S345C	17.2 ± 2.2	1.1 ± 0.1
F346C	18.7 ± 3.1	1.9 ± 0.3
L347C	44.6 ± 9.4	1.4 ± 0.1
T348C	27.3 ± 7.8	1.4 ± 0.1
D349C	N.D.	N.D.
W350C	54.1 ± 8.6	1.5 ± 0.1
V343C/I328C	8.5 ± 1.3	1.2 ± 0.2
G344C/I328C	18.2 ± 3.4	1.0 ± 0.0
S345C/I328C	6.7 ± 0.6	1.5 ± 0.2
S345C/I328S	10.6 ± 3.3	1.1 ± 0.2
F346C/I328C	7.7 ± 2.1	1.3 ± 0.1
L347C/I328C	12.4 ± 3.2	1.4 ± 0.1
T348C/I328C	8.7 ± 3.0	1.2 ± 0.1
D349C/I328C	N.D.	N.D.
W350C/I328C	21.5 ± 4.2	1.2 ± 0.1
I328C at 365nm	3.8 ± 0.5	1.2 ± 0.2
I328C at 525nm	3.3 ± 0.4	1.4 ± 0.2
I328C/S345C at 365nm	0.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1
I328C/S345C at 525nm	1.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1
rP2X2 WT	39.6 ± 7.0	1.5 ± 0.1
G342P in rP2X2	1.6 ± 0.4	1.1 ± 0.1
G342A inrP2X2	94.1 ± 13.0	1.3 ± 0.1

All cysteine mutants were generated on the rP2X2-3T background. G342P and G342A mutations were generated on the rP2X2 receptor. All data are means ± s.e.m., n= 4-7 from at least two transfections.

Concentration-response relationships for activation by ATP at 365 nm and 525 nm were determined in cells previously treated for 20 min with 1 μM (for I328C/S345C) or 50 μM MAM (for I328C) in the presence of 3 μM ATP. For I328C, ATP-gated currents were measured at 350 ms under 525 nm light or in the dark after illumination at 365 nm. For I328C/S45C, ATP-gated currents were measured in the dark after switching to the indicated wavelength.

N.D. not determined. [1]Data taken from (28).

Table S3. Relative ion permeability for chloride

Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Man (mV)	E_{rev} Na-Ise (mV)	P_{Cl}/P_{Na}
ATP-gated				
P2X2-3T	-4.3 ± 5.4[1]	-32.5 ± 9.4[1]	1.2 ± 5.9[1]	0.10 ± 0.14[1]
Light-gated				
I328C	1.2 ± 1.7	-25.0 ± 2.5	-2.8 ± 2.1	0.09 ± 0.03
I328C/S345C	-2.8 ± 1.9	-24.7 ± 2.8	-1.7 ± 1.9	0.14 ± 0.03

Data are means ± s.e.m., n= 8-9 from at least two transfections. For the P2X2-3T receptor, ATP concentration was 10 μM. Labeling of mutants was performed in the presence of 3 μM ATP and 1 μM (for I328C/S345C) or 50 μM (for I328C) MAM.

[1]Data taken from (28).

Table S4. Relative ion permeability for calcium

Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	E_{rev} Ca (mV)	P_{Ca}/P_{Na}
ATP-gated			
P2X2-3T	7.7 ± 3.6[1]	9.2 ± 2.8[1]	2.08 ± 0.22[1]
Light-gated			
I328C	1.1 ± 2.5	-5.3 ± 2.7	1.30 ± 0.04
I328C/S345C	-0.4 ± 2.2	-4.4 ± 1.5	1.53 ± 0.14

Data are means ± s.e.m., n= 8 from at least two transfections. For the P2X2-3T receptor, ATP concentration was 10 μM in NaCl solutions and 300 μM in Ca solutions. Labeling of mutants was performed in the presence of 3 μM ATP and 1 μM (for I328C/S345C) or 50 μM (for I328C) MAM.

[1]Data taken from (28).

Table S5. Relative ion permeability for NMDG

		E_{rev} NMDG (mV)		P_{NMDG}/P_{Cs}	
Constructs	E_{rev} NaCl (mV)	initial	60s	initial	60s
ATP-gated					
P2X2-3T	-9.8 ± 5.7[1]	-73.7 ± 5.5[1]	-49.1 ± 10.5[1]	0.07 ± 0.01[1]	0.20 ± 0.06[1]
Light-gated					
I328C	-3.2 ± 1.4	-78.3 ± 1.8		0.04 ± 0.01	
I328C/S345C	-4.9 ± 1.3	-49.3 ± 2.5		0.15 ± 0.01	

Data are means ± s.e.m., n= 6-9 from at least two transfections. For the P2X2-3T receptor, ATP concentration was 100 μM. Labeling of mutants was performed in the presence of 3 μM ATP and 1 μM (for I328C/S345C) or 50 μM (for I328C) MAM.

[1]Data taken from (28).

Table S6. Single-channel properties of light-gated and ATP-gated receptors

Constructs	Conductance (pS)				Relative area (%)			
	Full open state	Sub-states			Full open state	Sub-states		
	O	S	S1	S2	O	S	S1	S2
ATP-gated								
rP2X2-3T	32.2 ± 0.7	15.0 ± 1.3	-	-	11.1 ± 3.6	9.5 ± 2.4	-	-
Light-gated								
I328C	20.4 ± 1.4	9.8 ± 2.0	-	-	5.8 ± 1.4	11.9 ± 0. 7	-	-
I328C/S345C	24.9 ± 0.7	-	5.4 ± 0.5	13.6 ± 0.8	6.2 ± 0.4	-	23.5 ± 4.9	14.9 ± 4.6

Data are means ± s.e.m. (n = 4-6 patches)

4. Exploration des mouvements des hélices TM2 intracellulaires au cours du gating

4.1. Contexte

Lors de l'exploration des transitions allostériques par la sonde moléculaire MAM, la flexion de l'hélice a paru être un phénomène important dans le mécanisme de gating du récepteur. J'ai donc décidé d'explorer la relation entre ce mouvement au sein du canal et la liaison de l'ATP. Browne et al. ont démontré que chacune des trois sous-unités contribuait de manière symétrique à l'ouverture du canal (Browne et al., 2011) ; en revanche la liaison de deux molécules d'ATP sur deux des trois sites possibles suffit à entraîner efficacement l'activation du récepteur (Stelmashenko et al., 2012), quand est-il pour ce mouvement de flexion ? Sa contribution à l'ouverture du canal est-elle symétrique ? Est-il associé à la fermeture d'un site situé sur la même sous-unité ?

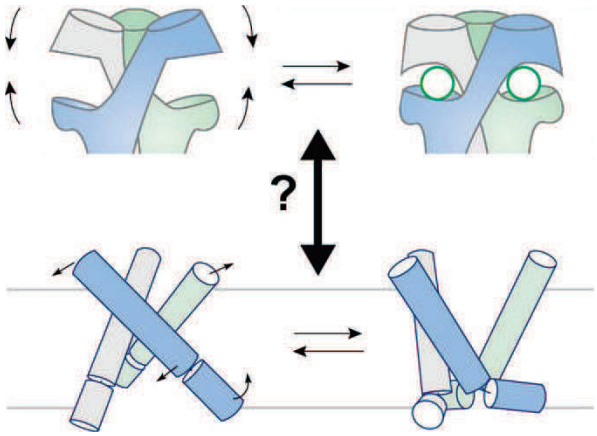


Figure 4.25 : Le mouvement de fermeture de la m choire est-il associé à la flexion de TM2 ?

4.2. Stratégie

Pour répondre à ces différentes questions, j'ai décidé d'exploiter, dans un premier temps, la différence de profils d'activation des récepteurs rP2X3, rP2X2 et des hétéromères rP2X2/P2X3 en réponse à l'α,β-meATP. En effet, les homotrimères rP2X3 désensibilisent rapidement et ceux formés par l'association de rP2X2 ne sont pas activés par des concentrations inférieures à 100µM. En revanche, lors de co-transfections, les

hétérotrimères qui s'associent avec une stœchiométrie définie rP2X2(rP2X3)$_2$ répondent à des concentrations faibles (<100µM) d'α,β-meATP et ont un profil de désensibilisation lent (Liu et al., 2001), ce qui permet de discriminer les constructions (Figure 4.26). De plus, la mutation K69A sur rP2X2 permet d'abolir la liaison de l'ATP sans impact sur l'affinité apparente pour l'α,β-meATP sur les constructions de type rP2X2(rP2X3)$_2$ (Wilkinson et al., 2006), suggérant une contribution mineure du site formé par la sous-unité P2X2 sur les hétéromères (Figure 4.26).

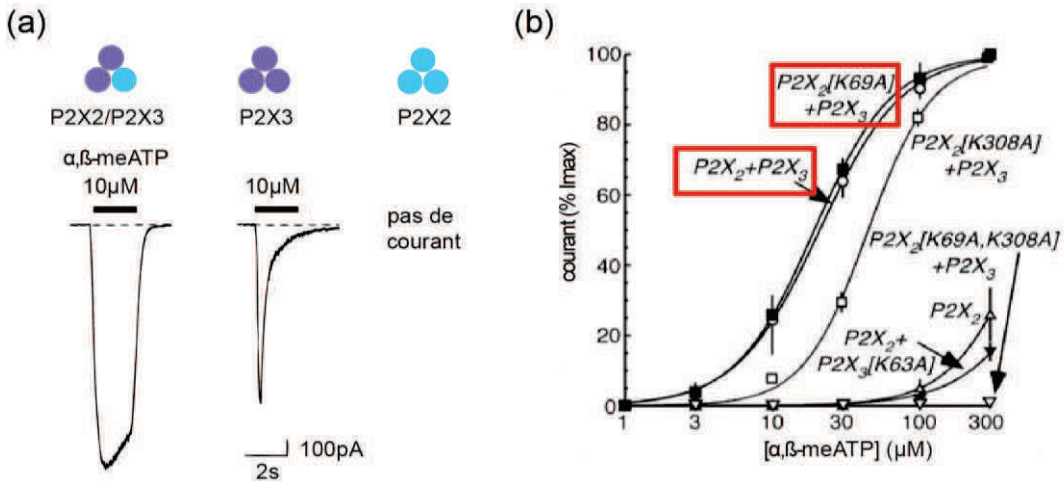


Figure 4.26 : Caractéristiques électrophysiologiques des hétéromères P2X2/3. (a) Traces électrophysiologiques enregistrée sur des cellules HEK-293 exprimant des hétéromères rP2X2/rP2X3 ou des homomères rP2X3 lors d'une application d'α,β-meATP. Les homomères rP2X2 ne sont pas activés par des concentrations inférieures à 100µM d'α,β-meATP. (b) Effets de la mutation en alanine des lysines K69 et K308 (rP2X2) et des résidus homologues sur rP2X3. La mutation K69A ne modifie pas l'affinité apparente pour l'α,β-meATP (adapté de Wilkinson et al., 2006 et Jiang et al., 2003).

On peut donc, en introduisant conjointement ou non la mutation G342P sur la sous-unité rP2X2 et la mutation proline homologue G333P sur rP2X3, concevoir par co-transfection des hétérotrimères avec une, deux ou trois prolines sur le segment transmembranaire, ceci étant rendu possible par la stoechiométrie d'assemblage définie rP2X2(rP2X3)$_2$. Ces différentes constructions doivent permettre de comprendre la contribution de la flexion de chaque sous-unité au phénomène de gating. On peut alors abolir la liaison de l'ATP sur un site par l'introduction de la mutation K69A sur rP2X2, mutation qui permet de conserver la réponse à l'agoniste, et observer ainsi les effets sur l'affinité apparente pour l'α,β-meATP afin de mettre en évidence cette fois-ci, le potentiel couplage allostérique entre le phénomène de liaison de l'ATP et la flexion du segment transmembranaire (Figure 4.27).

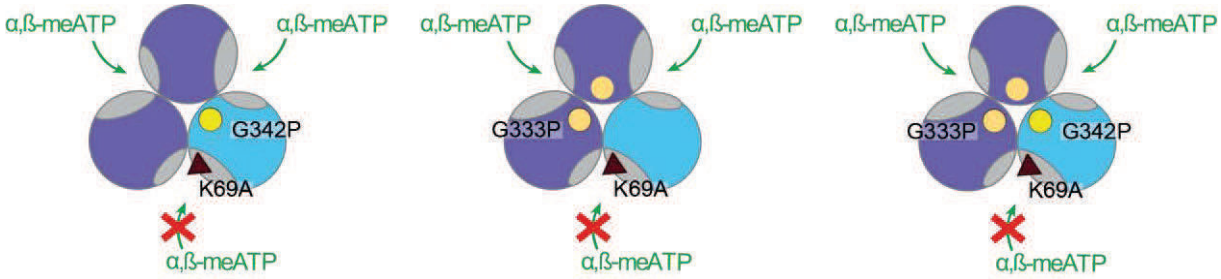


Figure 4.27 : Stratégie utilisant les cotransfections de sous-types P2X2 et P2X3. Les hétéromères possèdent chacun 2 sous-unités rP2X3 (violette) et une sous-unité rP2X2 (bleue), cette dernière portant la mutation K69A qui abolit la liaison de l'ATP, créant un site inefficace. Les mutations homologues G333P (rP2X3) et G342P (rP2X2) sont introduites conjointement ou non pour créer des constructions où le nopmbre de prolines est incrémenté progressivement.

Pour être complet, des concatémères rP2X2 ont également été conçus, avec un site de liaison de l'ATP abolit sur la deuxième sous-unité et toutes les combinaisons possibles de prolines sur les segments transmembranaires.

Nous envisageons également d'exploiter la présence d'un site zinc en bordure de la mâchoire du site orthostérique du récepteur. En effet, sur les récepteurs rP2X2 sauvages, fixé à son site de haute affinité (essentiellement H120 et H231 sur rP2X2) il est un potentiateur allostérique à faible dose et n'active pas *per se* le récepteur. Sur le mutant spontanément ouvert T339S, l'activation par le zinc seul du récepteur (EC50 de 221µM) a montré le rapprochement des bords de la mâchoire lors du gating (Jiang et al., 2012), il peut donc être utilisé comme un senseur des mouvements de fermeture du site de liaison de l'ATP. On espère ainsi, comprendre la contribution au phénomène de gating de la flexibilité de l'hélice et sa répercussion sur le site de liaison. Enfin, pour définitivement prouver ce mouvement, quelques sites de pontages ont été ingénieré.

4.3. Matériel et Méthodes

Concatémères

Les constructions concatémères sont conçues de la même manière que précédemment à partir de la construction sauvage rP2X2 (et non plus rP2X2-3T).

Cotransfections

Les co-transfections sont réalisées comme précédemment décrit dans des cellules HEK-293 avec des quantités d'ADN de 0,2µg pour le sous-type rP2X2 et 1µg de rP2X3. Ces proportions

correspondent à celles décrites par Jiang et al. (Jiang et al., 2003) optimisées pour obtenir des hétérotrimères principalement. La quantité d'ADN utilisée pour la transfection des concatémères est de 0,3µg.

Electrophysiologie

Les solutions d'α,β-meATP sont préparées extemporanément à partir d'une solution dans l'eau à 100mM.

4.4. Résultats

Les assemblages hétéromériques testés rP2X2(rP2X3)$_2$, [G342P]rP2X2(rP2X3)$_2$, [K69A,G342P]rP2X2(rP2X3)$_2$, [K69A]rP2X2([G333P]rP2X3)$_2$ et [K69A,G342P]rP2X2([G333P] rP2X3)$_2$ sont tous fonctionnels et seules les cellules présentant un profil de désensibilisation lent lors d'une application de 30µM d'α,β-meATP sont analysées. Conformément aux résultats de Wilkinson et al. obtenus sur des hétéromères rP2X2/rP2X3, l'introduction de la mutation K69A n'induit pas de modification de l'affinité apparente pour l'α,β-meATP (EC_{50} [G342P]rP2X2(rP2X3)$_2$ = 6,7 ± 2,8 µM et EC_{50} [K69A,G342P]rP2X2(rP2X3)$_2$ = 5,9 ± 0,6 µM), de plus la valeur d'EC_{50} calculée pour le récepteur wild-type est identique à celle publiée (EC_{50} rP2X2(rP2X3)$_2$ = 27,1 ± 4,0 µM), ce qui valide notre protocole. Par ailleurs, l'analyse des courbes dose-réponse à l'α,β-meATP montrent un gain d'affinité apparente progressif en fonction du nombre de proline introduites sur le segment transmembranaire d'un facteur 5 (une proline) à 10 (deux ou trois prolines) (EC_{50} [K69A]rP2X2([G333P]rP2X3)$_2$ = 0,31 ± 0,03 µM et EC_{50} [K69A,G342P]rP2X2([G333P]rP2X3)$_2$ = 0,037 µM) (Figure 4.28).

Toutes les constructions concatémères testées contenant la mutation K69A en position 2 sont fonctionnelles. Par manque de temps, leur expression en surface n'a pas encore été vérifiée. Aucune différence significative d'EC_{50} pour l'ATP n'est observable entre la construction contrôle K69A (OIO) (EC_{50} =68 ± 9 µM) et celles possédant une seule mutation proline sur le background K69A G342P (IOO) (EC_{50} = 53 ± 3 µM), G342P (OIO) (EC_{50} = 72 ± 8 µM) et G342P (OOI) (77 ± 23 µM) suite à l'introduction en position 1, 2 ou 3 respectivement. Lorsque trois prolines sont présentes G342P (III), on observe un gain d'affinité important de l'ordre de ~30 fois (EC_{50} = 1,8 ± 0,2 µM) proche de celui observé sur

des récepteurs trimériques. Les constructions sur lesquelles deux prolines ont été introduites possèdent une affinité intermédiaire (EC_{50} = 35,3 ± 4,8 µM et EC_{50} = 32,1 ± 4,9 µM pour les constructions G342P (IIO) et G342P (OII) respectivement). De plus, le gain de fonction est plus important pour la construction ayant les deux prolines sur les sous-unités ne portant pas la mutation K69A (EC_{50} =8,1 ± 3,9 µM) (Figure 4.29).

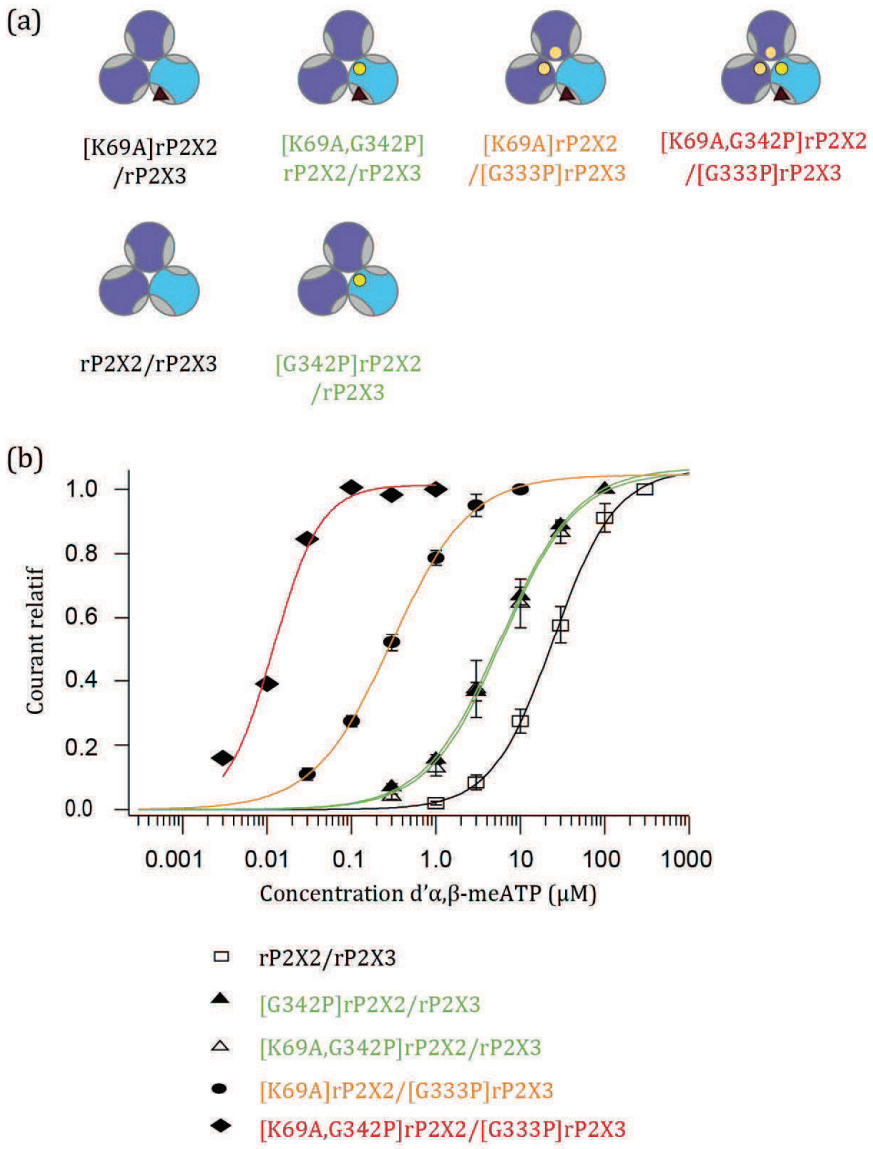


Figure 4.28 : Caractérisation de la réponse à l'α,β-meATP des hétérotrimères rP2X2/rP2X3. (a) Représentation schématique des différentes combinaisons rP2X2/rP2X3 testées, les sous-unités rP2X2 sont représentées en bleu clair, les sous-unités rP2X3 en violet, la mutation K69A est schématisée par un triangle pourpre et la mutation G342P ou G333P par un cercle jaune (b) Courbes dose-réponse à l'α,β-meATP. Les couleurs des courbes sont attribuées en fonction du nombre prolines présentes en position 342 (ou 333 sur rP2X3) sur la construction (rouge 3, orange 2, verte 1, noire aucune).

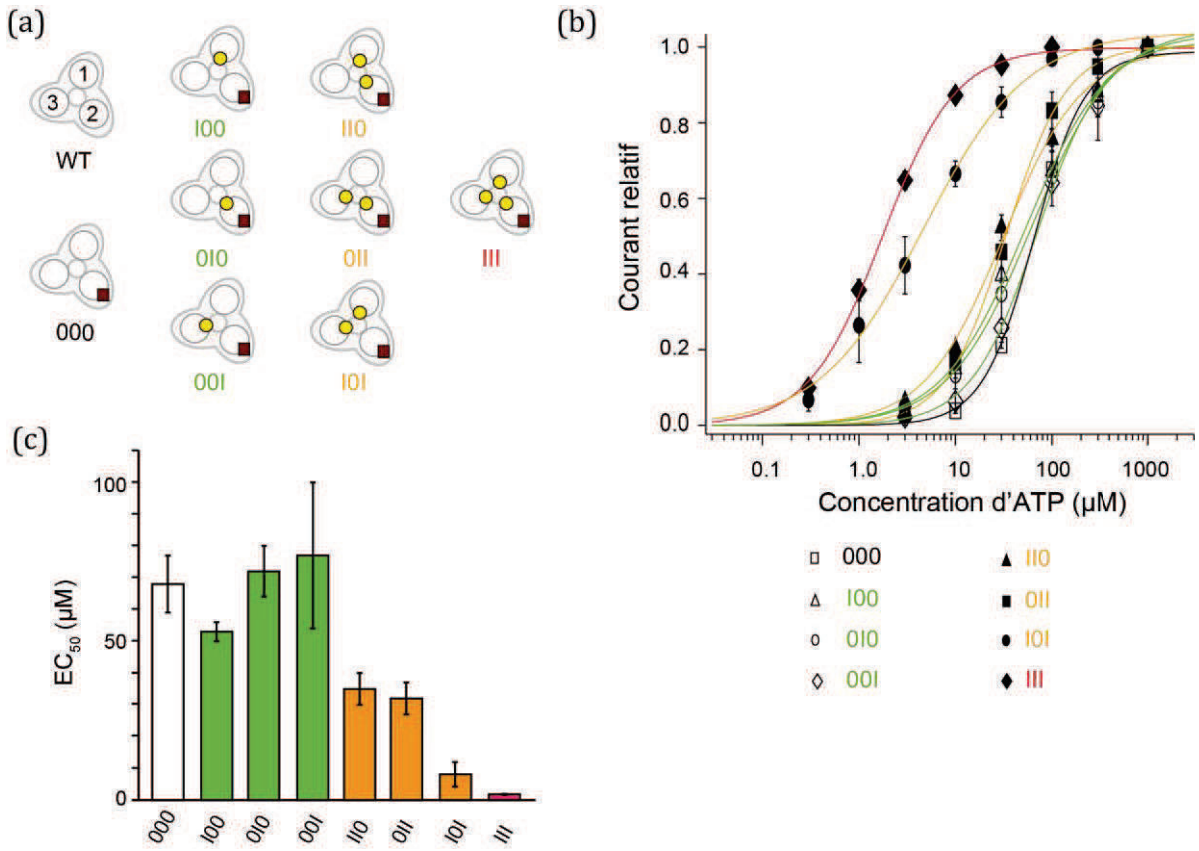


Figure 4.29 : Caractérisation de la réponse ATP des concatémères K69A/G342P rP2X2. (a) Représentation schématique des différentes constructions de concatémères rP2X2. La mutation K69A est schématisée par un carré pourpre, la mutation G342P par un cercle jaune. Concernant la nomenclature I marque la présence de la mutation, O le résidu sauvage. (b) Courbes dose-réponse à l'ATP des différentes constructions, les couleurs des courbes sont attribuées en fonction du nombre prolines présentes en position 342 (rouge 3, orange 2, verte 1, noire aucune). (c) Histogramme des EC_{50}.

Sur les récepteurs rP2X2 sauvages, le zinc est un potentiateur allostérique à faible dose et un inhibiteur à doses plus élevées : il n'active pas *per se* le récepteur mais augmente les courants lors d'une co-application avec l'ATP. En revanche, en l'absence d'ATP, le mutant G342P rP2X2 répond à de faibles concentrations de zinc avec une affinité apparente de 52,8 ± 6,0 µM (Figure 4.30). Sur les profils électrophysiologiques on remarque également un phénomène de rebond lors du lavage suite à l'application de concentrations de 300 et 500µM de zinc, suggérant la présence de deux sites de liaison, un d'activation de haute affinité et un probable d'inhibtition de faible affinité. Ce profil ressemblant à celui du récepteur T339S, il semblerait que le canal du mutant G342P soit spontanément ouvert. Pour tester cette prédiction, des enregistrements en configuration canal-unique ont été

réalisés mais les patchs des mutants G342P rP2X2 et G342P rP2X2-3T sont très bruités et aucun événement clair d'ouverture n'est discernable.

Afin de définitivement prouver la pertinence de la flexion de l'hélice, nous avons ingénierié des sites permettant la formation potentielle de ponts disulfures dans l'état ouvert ou le pontage par une autre molécule telle que le MAM ou les crosslinkers photoclivables, ceci ayant lieu si ce mouvement est vrai. Concernant la mutation simultanée des résidus L338C et L347C, nous n'avons aucune évidence électrophysiologique d'un pontage spontané entre ces résidus après application d'ATP. Nous n'avons pas eu l'occasion de tester notre série de crosslinkers photoclivables. La combinaison des mutations F346C/W350C n'a quant à elle pas permis un pontage par le MAM.

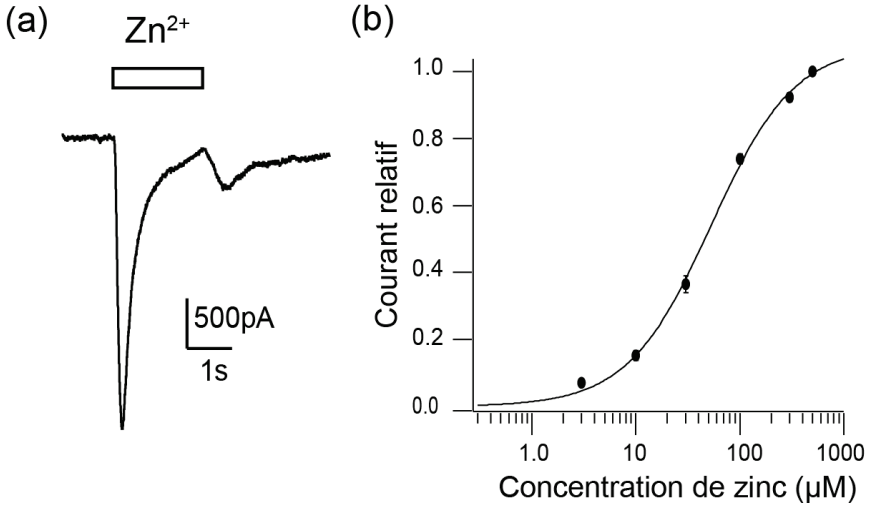


Figure 4.30 : **Le zinc est un agoniste du mutant G342P.** (a) Trace électrophysiologique enregistrée sur des cellules HEK-293 exprimant le mutant G342P rP2X2 lors d'une courte (2s) application de zinc (500µM). (b) Courbe dose-réponse au zinc moyenne du mutant G342P rP2X2.

5.1. Discussion

Tout d'abord, la sensibilité du mutant G342P à de faibles concentrations de zinc en absence d'ATP suggère que ce mutant, tout comme le mutant T339S, est constitutivement ouvert. La difficulté rencontrée pour obtenir des patchs non bruités en canal unique paraît confirmer cette hypothèse. Les résultats obtenus à la fois avec les cotransfections P2X2/P2X3 et les concatémères démontrent que la présence de cette proline sur le segment transmembranaire favorise l'ouverture du canal et il semblerait que ce phénomène augmente de façon proportionnelle au nombre de prolines introduites. Ces résultats sont en adéquation avec le fait que chaque segment TM2 contribue de manière symétrique à l'ouverture du canal et confirment que la flexion de l'hélice favorise l'ouverture du récepteur. Par ailleurs, le fait que le zinc devienne un agoniste sur le mutant G342P rP2X2 prouve également que la présence de la mutation dans le segment transmembranaire induit de manière allostérique un mouvement de fermeture de la mâchoire formant le site orthostérique. Du fait du gain d'affinité obtenu sur toutes les constructions rP2X2/rP2X3 dès lors que la proline est introduite indépendamment de sa position par rapport à la mutation K69A, et au vu des résultats similaires en terme d'affinité apparente pour l'α,β-meATP observés sur les mutants [G342P]rP2X2(rP2X3)$_2$ et [K69A,G342P]rP2X2 (rP2X3)$_2$, l'effet de la mutation semble se répercuter à la fois en inter et en intra sous-unité. Néanmoins, les résultats obtenus avec les concatémères viennent nuancer quelque peu ces conclusions dans la mesure où deux prolines sont cette fois-ci nécessaires à l'obtention d'un gain d'affinité et que leur position par rapport à la mutation K69A a une influence. Plusieurs explications peuvent être formulées au vu de ces résultats apparemment contradictoires. D'une part, les agonistes utilisés dans les deux expériences (α,β-meATP et ATP) bien que très proches structurellement, ne sont pas identiques. De même, deux sous-types différents de récepteurs sont utilisés (rP2X2 et rP2X3) ce qui peut avoir une influence sur la constante allostérique L pour un ligand donné. Si l'on suppose alors que L est plus grande sur le sous-type P2X2 que sur P2X3, c'est-à-dire qu'il s'active moins facilement suite à la laison de l'agoniste, le changement induit par l'introduction d'une seul proline n'est peut être pas suffisant pour être mesurable et est masqué par la variabilité inhérente aux cellules, expliquant alors l'absence apparente d'effet suite à l'introduction d'une seule proline sur les concatémères. D'autre part, les concatémères étant des constructions où les segments

transmembranaires sont reliés entre eux d'une sous-unité à l'autre, il y a une certaine contrainte des mouvements des extrémités C et N terminales (entre les sous-unités 1 et 2 et 2 et 3) qui pourrait expliquer en partie cette différence de résultats. Dans tous les cas, la tendance reste la même : nous avons mis en évidence un couplage allostérique entre une modification du site de liaison et une flexion de l'hélice transmembranaire.
En revanche, nous n'avons pas réussi à démontrer un rapprochement de résidus induit par la flexion supposée de l'hélice mais très peu de combinaisons ont été testées par manque de temps et ce volet nécessite une exploration plus systématique.

5. Exploration des cinétiques et de la désensibilisation

5.1. Contexte

Le dernier volet de ces travaux de thèse concerne l'étude cinétique de l'activation par le MAM du récepteur I328C rP2X2-3T. Le profil électrophysiologique particulier observé lors des projets précédents a suscité de nombreuses questions concernant la pertinence des contraintes imposées par la molécule vis-à-vis de celles imposées par la protéine. En effet, on observe une inactivation progressive des courants induits par une irradiation à 525nm jusqu'à atteindre un plateau distinct de l'état fermé du récepteur (Figure 4.14). Ce phénomène se produit malgré la prolongation de l'irradiation, cette dernière ralentissant alors la cinétique, ce qui suggère une réorganisation du canal indépendante de l'isomérisation du MAM. En revanche, sur le même mutant, les molécules qui ne possèdent qu'un seul point d'attache au sein de la protéine (MEA-TMA et MAS) provoquent des courants de photorégulation bistables pendant et après une irradiation (Figure 4.3 et 4.13). Cette différence de profil de stabilité des courants, observée sur le mutant I328C, marqués par différentes molécules dérivées d'azobenzène, indique que les mécanismes de photorégulation impliqués sont distincts, et que, dans le cas du MAM, la protéine impose un retour à une conformation allostérique inactive. L'inactivation des courants provoquée par le MAM s'apparente ainsi à la désensibilisation du récepteur observée lors d'une application d'ATP. Par ailleurs, l'étude du mécanisme d'optogating suggère que le MEA-TMA stabilise les interfaces transmembranaires. Nous avons alors voulu explorer plus en détails ces différents

phénomènes afin de comprendre l'importance des différents mouvements et interfaces dans le gating et la désensibilisation du récepteur.

5.2. Stratégie

Si l'inactivation des courants photoinduits par le MAM est proche du phénomène de désensibilisation du récepteur, il est possible que d'autres phénomènes propres à l'activation du canal soient reproduits. Il a donc paru intéressant, dans un premier temps, de réaliser une analyse cinétique des phénomènes de désensibilisation et re-sensibilisation induits par l'irradiation visible suite au marquage par le MAM du mutant I328C rP2X2-3T. Par la suite, nous avons envisagé d'exploiter la différence de profils électrophysiologiques observée avec les deux molécules pour étudier l'inactivation des courants. Etant donné que le récepteur est trimérique et que le MAM ponte deux résidus cystéines entre eux, la troisième cystéine est normalement disponible pour un marquage au MEA-TMA. Cette dernière molécule n'entraîne pas de phénomène de désensibilisation ni de resensibilisation. L'introduction du MEA-TMA conjointement au MAM pourrait donc avoir une influence sur les courants de photorégulation induits par le MAM et empêcher l'inactivation du récepteur.

5.3. Matériel et Méthodes

Après une incubation de 20 min avec le MAM (5µM dans du NES 1%DMSO + 3µM ATP), les cellules HEK exprimant I328C rP2X2-3T sont lavées puis incubées ou non 5min avec le MEA-TMA (200µM). Les courants de photorégulation sont enregistrés après une courte irradiation à 365nm pour basculer tous les isomères dans la configuration *cis*.

5.4. Résultats

Analyse cinétique suite au marquage par le MAM

L'isomère *trans* étant thermodynamiquement stable et le marquage se faisant en absence d'irradiation, un pulse d'UV est systématiquement appliqué sur les cellules avant les enregistrements pour basculer toutes les molécules dans un état *cis*. Sur les cellules exprimant le mutant I328C rP2X2-3T et marquées par le MAM, lorsque ce pulse n'est pas appliqué, le premier courant observé lors d'une irradiation à 525nm est d'intensité plus faible (~40%) par rapport au courant maximum observé. Lors d'irradiations successives par des pulses de lumière visible sans intercaler d'irradiation UV, l'intensité des courants photoinduits est également réduite dans les mêmes proportions. Une fois le plateau de désensibilisation atteint (entre 5 et 10s après l'irradiation visible), ce phénomène est indépendant du temps espaçant deux irradiations successives (pannel (a) haut et (b) de la Figure 4.30). En revanche, une courte irradiation UV précédant l'irradiation visible permet de retrouver une activation d'intensité plus forte, sans pour autant retrouver le niveau initial lorsque les deux irradiations (UV et visible) ne sont pas espacées (pannel (a) bas et (b) de la Figure 4.31). Les temps d'irradiation étant très courts (80ms pour l'UV, 350ms pour le visible) il se peut que les changements induits par l'isomérisation du MAM sur la protéine soient plus lents et nous avons donc espacé progressivement les deux irradiations : on retrouve alors un courant maximum au bout de 1 seconde dans l'obscurité (pannel (c) de la Figure 4.31). Au cours de l'irradiation prolongée à 525nm, la cinétique de désensibilisation est plus lente que celle qui fait suite au pulse de lumière visible mais le plateau atteint (14% du courant initial) est identique (Figures 4.31 et 4.32).

Analyse cinétique suite au marquage par le MAM et le MEA-TMA

Après incubation par le MAM et une courte irradiation dans l'UV, les courants observés à la fin d'une irradiation longue de 5s à 525nm sur les cellules marquées représentent 14% du courant initial. Après incubation successive par le MAM puis par le MEA-TMA, les courants mesurés à 5s d'irradiation visible s'élèvent à 80% du courant initial (Figure 4.32). Le MEA-TMA empêche donc l'inactivation des courants provoquée par le marquage par le MAM seul.

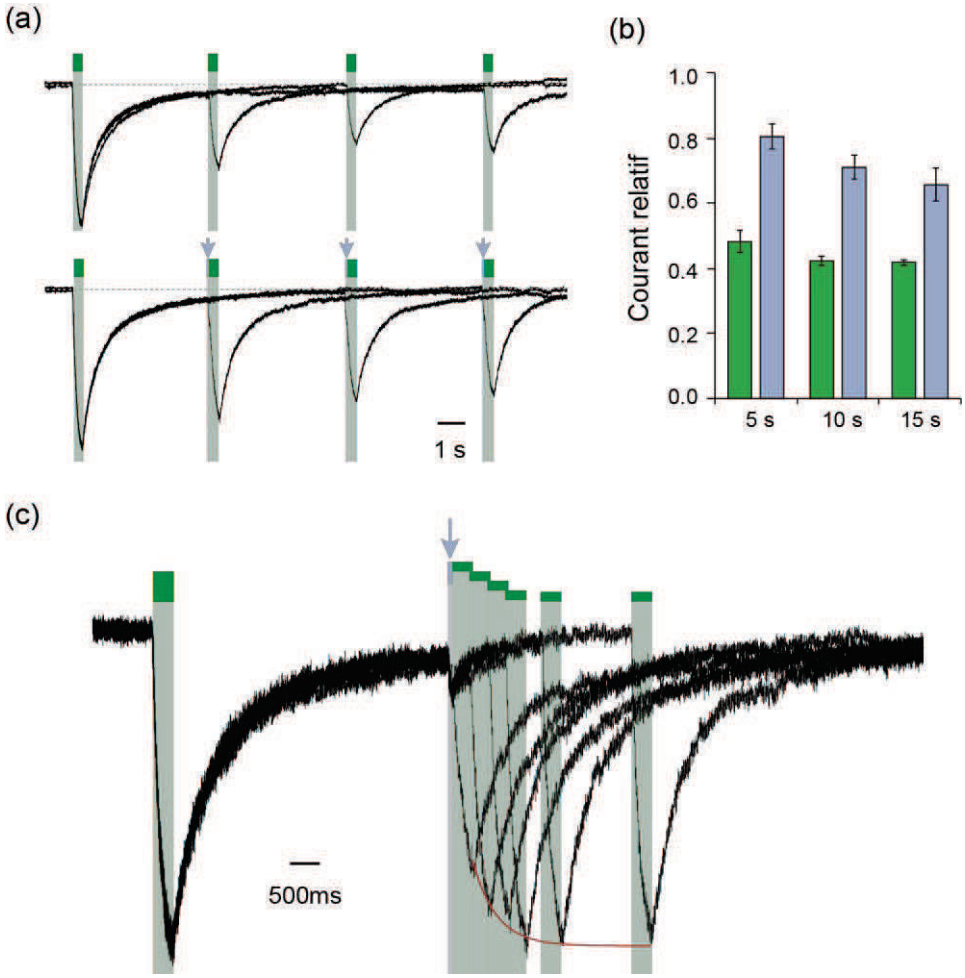


Figure 4.31 : **Exploration cinétique du mutant I328C marqué par le MAM**. (a) Superposition des traces électrophysiologiques enregistrées sur une même cellule lors d'irradiations à 525nm espacées par différents temps. Un court pulse d'UV précède (en bas) ou non (en haut) l'irradiation visible. (b) Histogramme du ratio des courants induits par une deuxième irradiation visible espacée de la première par différents temps par rapport au courant maximal initial. Un court pulse d'UV précéde (violet) ou non (vert) la deuxième irradiation. (c) Superposition des courants photoinduits enregistrés sur une même cellule en espaçant l'irradiation à 525nm progressivment du pulse d'UV. La courbe rouge représente le retour de la sensibilité.

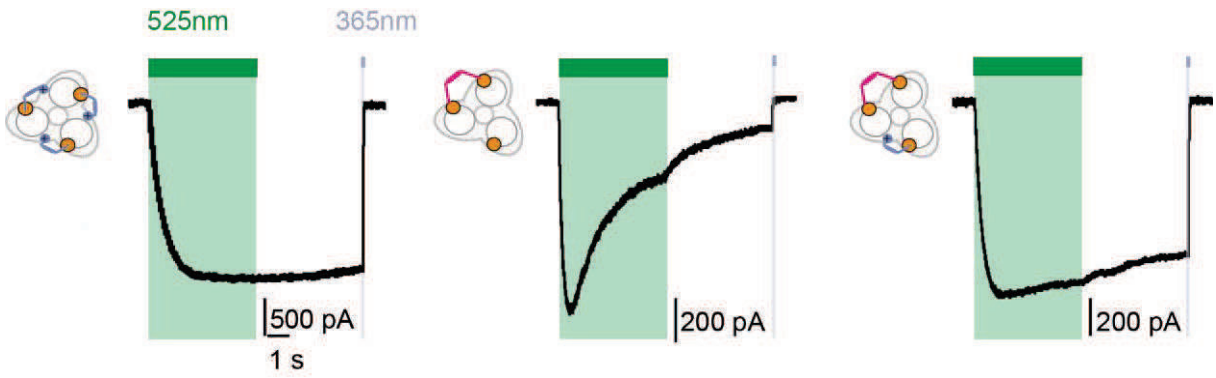


Figure 4.32 : Etude du phénomène d'inactivation. Représentation schématique du récepteur I328C rP2X2-3T marqué par le MEA-TMA (gauche), le MAM (milieu), et les deux molécules (droite) et traces électrophysiologiques enregistrées lors d'une irradiation à 525nm de 5s . La présence du MEA-TMA diminue fortement le phénomène de désensibilisation. Le MAM est représenté en rose, le MEA-TMA en bleu, la mutation I328C par un cercle orange.

5.5. Discussion

L'observation de courants, certes de moindre intensité, lors d'irradiations répétées à 525nm implique qu'une proportion de molécules de MAM retourne dans un état *cis* en l'absence d'irradiation UV, état qui en solution est thermodynamiquement instable. La protéine impose donc au MAM d'adopter une configuration de haute énergie et déplace l'équilibre en faveur de l'état *cis*. Par ailleurs, le courant entrant qui apparaît lors d'une irradiation longue à 365nm (>100ms) est le reflet d'un état photostationnaire du MAM du au recouvrement partiel des spectres d'absorption à cette longueur d'onde. Dans ces études, le choix des longueurs d'ondes d'irradiation a été guidé par le comportement de l'amidoazobenzène en solution, or nous n'avons aucune information sur l'influence du marquage et de la protéine sur le phénomène d'isomérisation, il serait donc intéressant de tester toute une gamme de longueur d'onde sur les cellules marquées afin d'identifier celle qui permettrait de diminuer au maximum la proportion d'isomère *trans* en faveur de l'isomère *cis et vis versa* pour optimiser la photorégulation. De plus, si l'isomérisation du MAM en solution est de l'ordre de la picoseconde, qu'en est-il une fois fixé au sein de la protéine ? En effet, la cinétique d'ouverture par l'irradiation visible est proche de la centaine de milliseconde. Par ailleurs, la diminution importante des courants observées en l'absence d'irradiation après un pulse à 525nm et le délai nécessaire au retour d'une réponse photoinduite maximale suite à une irradiation UV (~1s) démontrent, qu'en *sus* du

phénomène d'isomérisation du MAM, des contraintes inhérentes à la protéine viennent moduler les transitions entre les différents états provoquées par le MAM. Les phénomènes d'ouverture et de fermeture du canal par notre sonde sont donc complexes et il est difficile de discriminer la contribution de chaque composante dans les cinétiques observées. Il est important de noter que l'énergie apportée par l'isomérisation est certes suffisante pour induire une réorganisation des segments protéiques, mais que le récepteur lui-même impose une conformation puisque malgré une irradiation continue à 525nm, le phénomène de diminution des courants a quand même lieu. On peut ainsi émettre l'hypothèse que les phénomènes observés en l'absence d'irradiation sont principalement dus à la protéine et doivent être proches d'un comportement physiologique, d'où notre comparaison à la désensibilisation et la re-sensibilisation du récepteur. Les résultats de la double incubation MEA-TMA et MAM sur les cellules exprimant le mutant I328C rP2X2-3T suggèrent que le MAM permet dans un premier temps l'ouverture du canal et que le MEA-TMA empêche la réorganisation intrinsèque de la protéine et stabilise un état ouvert. Il semblerait donc que si l'ouverture du canal soit permise par une expansion des hélices TM2, l'interface entre les sous-unités au niveau transmembranaire joue un rôle essentiel dans le phénomène de désensibilisation et pourrait constituer une nouvelle zone à cibler pour la conception rationnelle de modulateurs allostériques d'intérêt thérapeutique.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé deux outils optochimiques permettant, d'une part, de contrôler l'activité du canal d'un récepteur P2X possiblement rendu insensible à son ligand endogène, ce qui confère une spécificité de l'activation inégalée, et d'autre part, une sonde moléculaire permettant d'explorer des mouvements relatifs au sein de la protéine et de collecter des données de distance particulièrement utiles pour l'amélioration des modèles existants du récepteur. De surcroît, la sonde a permis d'identifier une flexibilité des segments transmembranaires essentielle au phénomène de gating qui n'avait pas encore été mise en évidence.

Le récepteur P2X2 insensible à l'ATP et marqué par le MEA-TMA permet, pour la première fois, une activation ciblée d'un sous-type particulier et ouvre la voie à des études physiologiques concernant le rôle des différents sous-types au sein d'un système biologique complexe.

Enfin, de précieuses informations concernant les variations d'interactions au sein des domaines transmembranaires impliquées lors du gating et de la désensibilisation du récepteur ont pu être déduites suite à l'utilisation de ces nouveaux outils optochimiques et pourraient guider le futur développement de molécules régulant l'activité des récepteurs P2Xs.

Du fait de la relative simplicité des molécules utilisées et surtout de l'absence de spécificité des mécanismes exploités pour ces stratégies, les deux outils pourraient être utilisés sur d'autres cibles.

La technique de l'optogating a déjà été étendue avec succès dans notre laboratoire aux autres sous-types de récepteurs P2Xs et peut certainement s'appliquer aux autres récepteurs canaux. Elle nécessite, bien évidemment, une période d'optimisation pour trouver le meilleur point d'ancrage de la molécule mais permet de s'affranchir des problèmes de synthèse chimique rencontrés lors du développement des PTLs. Cette technique est également applicable *in vivo* et peut profiter de l'essor des techniques d'optogénétique de ces dernières années. Néanmoins, des problèmes d'accessibilité à la

cible peuvent être rencontrés, en partie dus à la faible spécificité de la réaction de marquage utilisée. Une alternative serait, par exemple, d'introduire un acide aminé non naturel permettant une réaction bioorthogonale exclusive avec la molécule mais ceci soulève d'autres problèmes de manipulation génétique.

La sonde moléculaire est quant à elle plutôt destinée à une investigation *in vitro* mais constitue une approche prometteuse pour l'exploration des transitions allostériques de nombreuses protéines membranaires et pourrait devenir une approche complémentaire aux techniques *in silico* dans l'élaboration de modèles moléculaires. Les nombreux contrôles indispensables à réaliser pour vérifier la pertinence des données collectées constituent pour l'instant un frein à cette technique. De plus, elle nécessite d'avoir à disposition un modèle de la protéine étudiée pour orienter le choix des points de mutations et l'absence de cystéines endogènes accessibles susceptibles d'être marquées par la molécule.

Un des avantages du MAM est la possibilité d'incrémenter relativement facilement la distance séparant les deux groupements réactifs en modifiant la taille des bras espaceurs de part et d'autre de l'azobenzène. Ces nouvelles molécules pourraient permettre de piéger d'autres états du récepteur, en particulier l'état dilaté, ou d'autres mouvements impliquant des variations de distances plus grandes que celles explorées avec le MAM. Néanmoins, leur plus grande flexibilité sera peut être un problème pour, d'une part, induire une contrainte suffisante sur la protéine et, d'autre part, connaître avec certitude la distance entre les résidus pontés. En revanche, rigidifier la molécule pour diminuer la gamme de distances explorées peut conduire à des problèmes de solubilité majeurs et empêcher une utilisation de cette sonde sur des régions protéiques non membranaires.

Toujours est-il que ces deux nouveaux outils sont sans aucun doute le point de départ de nouvelles investigations moléculaires et physiologiques utilisant la lumière comme stimuli non invasif, réversible et précis.

ANNEXES

1. Article de revue

Sur invitation pour un Special Issue : Purines-Neurodegeneration
Soumis à Neuropharmacology

Molecular structure and function of P2X receptors

By Chloé Habermacher [a,b], Kate Dunning [a,b], Thierry Chataigneau [a,b] and Thomas Grutter [a,b,*]

[a] *Centre 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*

[b] *Université de Strasbourg, Faculté de Pharmacie, F-67400 Illkirch, France;*

* To whom correspondence should be addressed.

keywords: ATP, gating, ion channel, purinergic receptors, allosteric modulation

Abstract

ATP-gated P2X receptors are trimeric ion channels selective to cations. Recent progress in the molecular biophysics of these channels enables a better understanding of their function. In particular, data obtained from biochemical, electrophysiogical and molecular engineering in the light of recent X-ray structures now allow delineating of the principles of ligand binding, channel opening and allosteric modulation. However, although a picture emerges as to how ATP triggers channel opening, there are a number of intriguing questions that remain to be answered, in particular how the pore itself opens in response to ATP and how the intracellular domain, for which structural information is limited, moves during activation. In this review, we provide a summary of functional studies in the context of the post-structure era, aiming to clarify our understanding of the way in which P2X receptors function in response to ATP binding, as well as the mechanism by which allosteric modulators are able to regulate receptor function.

1. Introduction

Among the different transmembrane proteins involved in ionic transfer, the ligand-gated ion channels (LGICs) form an essential superfamily owing to the fact that they possess a number of key physiological roles, most notably the mediation of fast synaptic transmission (Bardoni et al., 1997; Lalo et al., 2012). The binding of a ligand in the extracellular domain triggers conformational changes that open the pore and allow the passage of ions along their electrochemical gradients. LGICs comprise three families of receptors, differing primarily in their oligomeric assemblies (Lemoine et al., 2012). Among these, trimeric P2X receptors, which are activated by extracellular ATP (Burnstock, 2006; North, 2002), are implicated in a diverse range of physiological and pathological processes, including pain sensation (Wirkner et al., 2007; Zhuo et al., 2011), inflammation (Idzko et al., 2014), taste (Kinnamon and Finger, 2013) and modulation of neurotransmitter release (Khakh and North, 2012; Lalo et al., 2012). These receptors are therefore promising therapeutic targets (Lemoine et al., 2012; North and Jarvis, 2013).

Thus far, seven different P2X subunits (P2X1-7) have been found in mammals, which assemble together in a homomeric and/or heteromeric fashion to form trimeric ion channel structures. Each subunit has several unifying features: C- and N-termini are located intracellularly, linked by two membrane-spanning segments (TM1 and TM2) and a large extracellular domain (ectodomain), where the ATP-binding sites are nestled (**Figure 1A**). In response to the binding of extracellular ATP, these receptors switch between different conformational states (Giniatullin and Nistri, 2013; Jiang et al., 2013; Moffatt and Hume, 2007). Initial agonist binding causes the receptor to progress from a closed, resting state to an open, conducting state (named I1), allowing the flow of Na^+, K^+ and Ca^{2+} across the membrane (Egan and Khakh, 2004). Prolonged exposure to ATP leads to the formation of a desensitized state, a temporary inactivation that terminates ion flux despite the fact that ATP

remains bound to the receptor. The kinetics of desensitization vary between P2X subtypes - fast desensitization is observed only with P2X1 and P2X3 receptors, whereas slow desensitization is observed for P2X2 and P2X4. In contrast, P2X7 receptors exhibit no apparent desensitization (North, 2002). Dissociation of ATP from the desensitized state, in turn, reverts the channel to the initial closed, resting state, in which it is able to be activated once again. This process is known as resensitization. A second conducting state (I2) is also found for selected P2X subtypes, whereby a dilation of the pore occurs, rendering the channel progressively permeable to larger cations and dyes (Khakh et al., 1999a; Virginio et al., 1999) (For a recent review see (Rokic and Stojilkovic, 2013)).

The recent determination of the crystal structures of the zebrafish P2X4 receptor (zfP2X4) in both an apo, closed-channel state (Kawate et al., 2009) and in an ATP-bound, open-channel state (Hattori and Gouaux, 2012) represented a landmark achievement in the understanding of the molecular architecture of these receptors. These structures allowed the confirmation of a wealth of biochemical and electrophysiological research previously carried out to probe the structure and function of P2X receptors. In addition to this, comparison of structures in the closed and open states has enabled identification of the extracellular motions, which follow ATP binding, thus providing us with a plausible mechanism for channel activation. However, in addition to the advances, the X-ray structures have also raised a number of intriguing questions. In particular, the molecular mechanism involved in the opening of the transmembrane pore itself still remains unclear and under debate. This is due, in part, to the fact that the intracellular domains, known to be of critical importance for P2X function, were removed for crystallization purposes. This review will provide a summary of functional studies in the context of the post-structure era, aiming to clarify our understanding of the way in which P2X recoptors function in response to ATP binding, as well as the mechanism by which allosteric modulators are able to regulate receptor function.

2. Global architecture

2.1. General topology of the ion channel

The concept of purinergic receptors was first proposed by Burnstock in the early seventies (Burnstock, 1972) but sustained studies in this field only began in 1994 following the first molecular identification of P2X receptors (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994). As P2X receptors had no sequence homology with other known ion channels, molecular and biochemical studies were first used to extensively explore the molecular structure. The general pattern of hydrophobicity suggested the presence of two domains of sufficient length to span the membrane (Brake et al., 1994; Valera et al., 1994) and complementary approaches such as N-glycosylation site tagging (Newbolt et al., 1998) provided early evidence of the intracellular location of both the N- and C- termini. Substitutions of residues of the putative transmembrane domains to tryptophan (Silberberg et al., 2005), cysteine (Jiang et al., 2001) or alanine (Li et al., 2004) highlighted a relative periodicity compatible with an alpha-helical organization. The peripheral location of TM1 was suggested by calcium permeability studies (Samways and Egan, 2007; Samways et al., 2008), whilst methanethiosulfonate (MTS) accessibility of residues mutated to cysteine (Jiang et al., 2001; Li et al., 2008) showed that TM1 has a limited contribution to the ion conduction pathway. In terms of global receptor structure, the stoichiometry of these receptors was for a long time debated (for a detailed review see (Hausmann et al., 2015)). A trimeric assembly was first proposed following immunohistochemical studies using PPAPA-crosslinked receptors for P2X1 and P2X3 (Nicke et al., 1998), engineered concatemeric receptors of P2X2 (Stoop et al., 1999) and disulphide bond experiments on cysteine-substituted heteromeric P2X2/3 (Jiang et al., 2003). Moreover, functional studies based on Hill slopes obtained from ATP dose-response curves and single-channel recordings (Ding and Sachs, 1999), along with low resolution structures of the

receptor by atomic force microscopy and electron microscopy (Barrera et al., 2005; Mio et al., 2005; Mio et al., 2009; Nakazawa et al., 2005; Shinozaki et al., 2009), further supported the originally proposed trimeric assembly of P2X receptors. The determination of crystal structures of a truncated zebrafish P2X4 receptor (ΔzfP2X4), firstly in 2009 resolved at 3.1Å in the absence of ATP (Kawate et al., 2009) and subsequently in 2012 bound to ATP at a resolution of 2.8 Å (Hattori and Gouaux, 2012), definitively confirmed this stoichiometry, as well as the global architecture of P2X receptors. These structures revealed the precise three-dimensional organization of the receptor and the folding of each subunit (**Figure 1A-C**). The overall shape of each individual subunit is likened to that of a dolphin, consisting of a body, head, tail, dorsal fin and left and right flippers (**Figure 1C**). This comparison allows a clear distinction of structurally differing regions. The large glycosylated ectodomain represents the body of the dolphin, and is comprised of highly conserved residues, organized into a rigid β-sheet structure and stabilized by five disulphide bonds. Branching out from this core body region are four more structurally flexible domains: the head, dorsal fin, left and right flippers (**Figure 1C**). The transmembrane domains, likened to the dolphin tail, were confirmed to be organized into alpha-helices. TM1 is positioned peripherally to TM2 and the ion conducting pore is lined primarily by the association of three TM2 helices, angled at 45° from the normal of the membrane plane (**Figure 1A and B**). The gate of the channel is defined by the hydrophobic region between L340 and A347, centred at the residue A344, approximately halfway down the length of the TM2 helix. The structure of the zfP2X4 receptor solved in the absence of ATP, presumably in the closed state, reveals inter- and intra-subunit interfaces with extensive interactions in the upper body, each monomer twisting around its neighbours. Two potential pathways through which ions can access the pore were identified: a central pathway, whereby ions enter the channel vertically *via* three connected vestibules positioned along the central axis of the receptor, or alternatively, a lateral pathway, whereby ions enter

the channel through three fenestrations located above the gate region. However, MTS accessibility studies and electrostatic free energy calculations (Kawate et al., 2011; Samways et al., 2011) strongly suggest that extracellular ions use the lateral pathway, entering the channel preferentially through the fenestrations before flowing through the ion pore itself.

2.2. Location of the ATP sites

Systematic site-directed mutagenesis coupled with electrophysiology provided much of the information crucial for locating the ATP binding sites. Several recent reviews focused on this aspect of P2X function (Chataigneau et al., 2013; Evans, 2009). Evidence that the formation of a ligand-binding site requires the involvement of two subunits was provided by co-expression of rP2X3 with mutated K69A/K308A rP2X2 (a non-functional, "dead" subunit) (Wilkinson et al., 2006), in addition to SDS-page gels of K69C/F289C rP2X2 receptor in both presence and absence of ATP (Marquez-Klaka et al., 2009). Many strategies were also employed to determine the specific residues which are involved in binding ATP. Among them, charge-dependent effects induced by MTS labelling of cysteine introduced at positions I67 or L186 (Jiang et al., 2000) and activation of the receptor following ADP-ribosylation at position R125 (P2X7) (Adriouch et al., 2008) suggested that these particular residues are in close proximity to the bound agonist. A strategy of site-directed affinity labelling was developed by Jiang *et al.*, using a thiol-reactive probe (8-thiocyano-ATP) to demonstrate the involvement of two residues (N140 and L186 in rP2X2) in the coordination of the adenine ring of ATP (Jiang et al., 2011). Voltage-clamp fluorometry (VCF) experiments coupled with site-directed fluorescence labelling allowed Lorinczi *et al*. to successfully orientate the ribose moiety of the ATP molecule in the binding cavity of rP2X1 (Lorinczi et al., 2012). A combination of several studies revealed that there are eight highly conserved residues critical for ATP binding (K70, K72, N96, F188, T189, F297, R298 and K316 zfP2X4) insofar as

substitutions at these positions inhibit ATP currents (Ennion et al., 2000; Fischer et al., 2007; Roberts et al., 2008; Wilkinson et al., 2006; Yan et al., 2006; Zemkova et al., 2007).

The crystal structures of zfP2X4 confirm the implication of residues previously identified to bind ATP (Hattori and Gouaux, 2012). These residues form a tight cluster, located within an intersubunit cavity and surrounded by the head and left flipper of one subunit and by the dorsal fin of another (**Figure 1D**). Several unanticipated interactions were also revealed: briefly, the residue L217 is involved in the recognition of the solvent-accessible ribose ring, the residues K70, K72, K316, N296 and R298 stabilize the triphosphate tail in an unusual U-shaped structure, K70 and T189 form hydrogen bonds with the adenine base, whilst L191 and I232 coordinate this adenine by means of hydrophobic interactions.

3. Structural point of view of the gating mechanism

Following the resolution of the crystal structures, a key issue for current research is the investigation into how ATP-binding can open the channel. In 2009, Shinozaki *et al*. provided the first time-lapse imaging of P2X4 receptor's structural changes in response to ATP application using fast-scanning AFM (Shinozaki et al., 2009). In the presence of ATP, individual subunits were observed, which draw away from one another to form the central pore. Since this study, several functional studies using the substituted-cysteine accessibility method (SCAM) (Samways et al., 2014), engineered disulphide bonds (Du et al., 2012; Kawate et al., 2011; Kowalski et al., 2014; Roberts et al., 2012; Stelmashenko et al., 2014; Zhao et al., 2014) or VCF (Lorinczi et al., 2012) have provided scattered information, giving a glimpse into the gating mechanism. The resolution of an ATP-bound state thus represented a major advance, as it provided an unrivalled picture of an open channel. *In silico* modelling of the two structures provided a basis for further investigations, and a plausible model of gating gradually began to take shape, which can be dissected into 5 key steps: ATP binding,

tightening of the so-called binding "jaw", flexing of the lower body regions, expansion of the lateral fenestrations and subsequent pore opening. ATP binding provokes a global structural movement, whereby subunits bend outward and rotate, inducing an expansion in the lower body region. As the lower body is directly connected to the transmembrane domain, this movement in turn induces a displacement of the outer ends of the TM helices, opening the pore in an iris-like motion. Here, we will focus on molecular changes in key domains during gating.

3.1. Movement of the binding jaw

3.1.1. Reorganization of the binding loops following ATP binding

The ATP binding site, located in an inter-subunit cavity between the head domain of one subunit, and the dorsal fin of another, is often referred to as the "binding jaw". Evidence that the closure of this binding jaw plays an important initial role in the gating process has been provided by multiple recent studies. First, the presence of a zinc-binding site, naturally formed by residues H120 and H213 in the rP2X2 receptor, was exploited to display this closing motion of the binding jaw's two lips. ATP-currents on the double cysteine mutant H120C/H213C (rP2X2) are dramatically decreased and DTT treatment restores a high sensitivity state, indicating that these residues are found in close proximity (Nagaya et al., 2005). However, the distance between these positions as predicted by the closed structure is too large to form a disulphide bridge (15Å), which implies that the head and the dorsal fin domains must come closer together during activation. VCF experiments coupled with fluorescence labelling of G115C and G124C (hP2X1) also revealed that agonist binding induces a movement of the head domain of P2X1 (Lorinczi et al., 2012), a finding which was further supported by electron microscopy experiments (Roberts et al., 2012). Engineered histidine bridges formed between residues of the head domain and the right-flipper connecting

loop (Jiang et al., 2012a), or disulphide bridges formed between the top of the lower body and the right flipper (190C-284C), or between residues of the head region from two different subunits (138C-181C) (Roberts et al., 2012) highlighted the critical role of these segments in ATP function. Finally, using the closed state structure with ATP docked in its binding site according to the results of 8-SCN-ATP labelling (Jiang et al., 2011), two different sets of data were produced by normal mode analysis (NMA) (Du et al., 2012; Jiang et al., 2012a), both suggesting that a decrease in the distance between residues of the binding jaw located in two adjacent subunits occurs following ATP binding. These data combined thus demonstrate that ATP-induced tightening of the binding jaw correlates precisely with an opening of the channel.

Although no structure with a competitive antagonist bound to the receptor has been resolved to date, several studies suggest that these antagonists act by binding to the upper jaw and thus impairing jaw closure. hP2X1/DdP2X and hP2X1/hP2X2 chimeras allowed identification of a cluster of positively charged residues (KAKRK) in the head domain which contribute to suramin sensitivity (El-Ajouz et al., 2012). Moreover, the N140C mutant labelled with the NCS-ATP affinity probe displays decreased ATP-induced currents (Jiang et al., 2011) and binding of TNP-ATP, a presumably competitive P2X antagonist, blocks movement of the binding jaw (Jiang et al., 2012a). A recent study which uses NMA, principal component analysis (PCA) and short molecular dynamics (MD) simulations suggests the presence of at least three sites able to recognize the adenine group of ATP and thus three distinct recognition modes (Huang et al., 2014): the first mode being similar to that found in the open crystal structure, the second featuring the adenine group buried in the interface of the rigid lower body domains and finally a third mode whereby adenine is positioned near the base of the head domain, which could explain the previous results obtained by engineered site-directed affinity labelling. Interestingly, only the first recognition mode can promote an

effective downward motion of the head domain, whereas the other two modes are only able to induce outward or upward motions of the head. Jaw tightening therefore seems to be an essential step of the gating mechanism.

Other movements following ATP binding which occur in the loop regions surrounding the binding site were also identified as being critical for the initiation of pore opening. In particular, it has been shown that the left flipper must be pushed outward from the ATP binding pocket simultaneously to the cleft closure between the head and dorsal fin domains (**Figure 2A**). To this end, Zhao *et al*. introduced cysteine or histidine residues on the left flipper (V288C rP2X4) and dorsal fin (T211C rP2X4) and observed an inter-domain disulphide bond or zinc bridge respectively, which impaired channel gating by preventing the relative motion of the two domains. They predict, by MD simulations, that ATP binding may destroy the hydrophobic interactions between the left flipper and dorsal fin domains, induces repelling of V291 (zfP2X4) from the ribose of ATP and provokes closing motions of K193, L217 and I208 around the molecule of ATP, thus causing the downward motion of the left flipper and upward movement of the dorsal fin (Zhao et al., 2014). Other studies have probed the reorganization of the binding pocket by using disulphide bond engineering to restrict movement between the upper body and right flipper domains (N284C/K190C hP2X1) or between the head domain and the adjacent subunit (K138C/E181C hP2X1), revealing that a counter-clockwise rotation of the subunits may occur after ATP binding (Roberts et al., 2012). These results are consistent with MD simulations, which show a leftward motion of the loop F139-G146, situated within the head domain, and a rightward movement of the loop P169-A183 (**Figure 2A**), which is covalently linked to the head (Huang et al., 2014). In agreement with these movements, recent work has suggested that during ATP activation of the P2X2 receptor, a significant rearrangement of residues E167 and R290, which interact electrostatically in the closed state ATP binding site, enables R290 to form a new, strong ionic

interaction with the γ-phosphate oxygen of ATP, thus breaking the original salt bridge (Hausmann et al., 2013). This electrostatic switch appears to be a critical step that leads to channel opening.

3.1.2. **Intermediate activation state**

Some recent works have suggested the existence of intermediate states in P2X receptors which precede pore opening. The idea of such primed states in P2X receptors was first introduced by Moffat and Hume who incorporated a so-called "flipped" intermediate state into the simple allosteric model to explain the delay between ATP-binding and the observation of ionic currents (Moffatt and Hume, 2007). This assumption was later confirmed by two crucial studies. The first of these showed that the agonist 8-NCS-ATP tethered to L186C in rP2X2 receptor in which an allosteric reporter mutation, T339S, was introduced to observe spontaneous channel openings, does not lock the channel in the open state, but instead allows the channel to open in response to zinc (Jiang et al., 2012b) indicating that NCS-ATP actually may trap an intermediate state that precedes channel opening. A second study provides evidence that BzATP tethered in one of the three intersubunit ATP binding sites of P2X7 receptor induced conformational changes in the remaining sites, causing these sites to lose their high selectivity for ATP and to bind other pyrimidine and diphosphate nucleotide analogues (CTP, UTP and ADP) with greater efficiency (Browne and North, 2013).

The molecular movements underlying such primed states remain unclear, but recent works suggest that movements of the head domain may be able to occur not only as a result of ATP-binding, but equally in the absence of agonist. Normal mode analysis of zfP2X4 and molecular dynamics experiments (Huang et al., 2014; Zhao et al., 2014) showed a possible spontaneous downward motion of the head domain, resulting in the closure of the jaw in the

absence of ATP binding. This observation was confirmed by the spontaneous formation of a disulphide bond between residues of the dorsal fin and head domain (K113C and K201C, hP2X3), which impaired binding of a fluorescent ATP derivative, BODIPY-TR ATP (Kowalski et al., 2014). Such spontaneous movements of the binding jaw may therefore be related to the progress of the receptor towards these intermediate states.

It is known that strong cooperativity operates between the three binding sites of P2X receptors (Bhargava et al., 2012; Jiang et al., 2003; Yan et al., 2010), and that ATP association rates increase with the sequential binding of ATP. Experiments from heterotrimeric receptors and concatenated constructs (Stelmashenko et al., 2012) demonstrated that two molecules of agonist seem sufficient to open the channel. If this conclusion also stands true for NCS-ATP, one may speculate that the lack of irreversible trapping of the pore in the open state is due to the irreversible binding of only one NCS-ATP molecule. In this case, the binding of NCS-ATP to one of the three ATP-binding sites would allow the receptor to convert from the closed state to an intermediate state, and subsequent binding of a second molecule would eventually result in the full opening of the channel. Other experiments are needed to further clarify this issue.

3.2. ECD flexibility

The domains which form the ATP binding pocket are structurally coupled to the rigid body domain. As such, their movements are transmitted across the protein as a whole. But which residues in particular are essential in the gating mechanism? Among studies which explored the orthosteric sites, single channel recordings revealed a difference in the role of K69 and K308 (rP2X2). Whilst the spontaneous opening of the K69A/T339S receptor was no different than that seen in T339S, this spontaneous activity disappeared in the mutant K308A/T339S (Cao et al., 2007) suggesting a critical role for K308 in channel gating.

Interestingly, K308 (rP2X2) is located on the upper ends of β14, a β strand located in the body domain, which is directly connected to TM2 (**Figure 1C**). Du et al. also suggested a crucial role of this β strand and, following NMA simulations, proposed that the upper ends of β strands β14 and β1 of adjacent subunits undergo rotation in opposite senses, demonstrated by a decrease in the distance between K70 and K316 residues (zfP2X4). This rotation also causes the lower ends of these β strands to be pulled further apart from one another, a motion which in turn encourages the outward movements required for channel opening (Du et al., 2012).

Other studies have also demonstrated the necessity of this rotational motion of β1 and β14 strands of neighbouring subunits: the formation of disulphide bridges between I62C/D320C (hP2X1) (Roberts et al., 2012), E59C/Q321C (rP2X2) (Kawate et al., 2011) or S65C/D315C (rP2X2) (Stelmashenko et al., 2014) results in the inhibition of ATP-currents, which can be restored upon application of DTT. Moreover, in the lower part of the body domain, bridging of β1 and β8, which are connected to TM1, in the same subunit causes a decrease in gating (Stelmashenko et al., 2014), which suggests that the lower body region is involved in expansion movements not only between subunits but also within the subunits themselves (**Figure 2B**). The flexibility of this region seems to be essential in the gating mechanism, and has been further illustrated by several studies. First, Jiang *et al*. showed the role of an extracellular salt-bridge between β1 and β12 strands (E63/R274 rP2X2) in stabilizing the closed state (Jiang et al., 2010). Second, it has been demonstrated that the segment spanning G316-I333 (rP2X4) is essential in transmitting the signal for channel opening from the ATP binding site to the TM domains (Rokic et al., 2013). The residue G316 (rP2X4) is crucial for the flexibility of the lower body: an alanine substitution at this position, which rigidifies the structure, results in a decrease of ATP sensitivity as well as slower

activation and desensitization kinetics, whereas a proline mutation causes only a variation in kinetics (Yan et al., 2006).

From the crystal structures, it can be seen that no large conformational changes occur in the upper body domain. However, all vestibules located in the central part of the trimeric assembly can be seen to expand, whilst the interface of the upper and the central vestibules, near P95 (zfP2X4), is kept relatively narrow. Previous SCAM studies had also suggested the expansion of the central and extracellular vestibules (Allsopp et al., 2011). Interestingly, mutation of F95 to leucine in hP2X7, a residue equivalent to zfP2X4 I94, results in an altered modulation of the ATP response by the allosteric modulator GW791343, and also favours the opening of the channel (Michel et al., 2008).

3.3. Transmembrane motions and pore opening

As previously discussed, motions of the head domain induce an expansion of the upper vestibule, and the combined movements of the dorsal fin and left flipper cause the rotation and separation movements of the lower body domains, located near the membrane and connected to the TM helices, which, in turn, induce pore opening.

Prior to the publication of the closed and open structures, multiple mutagenesis studies focused on the characterization of TM1 and TM2. Extensive SCAM studies provided information about the location of the gate in the TM domain, despite some discrepancies on the exact position of the narrowest point in the channel (for a complete review see (Samways et al., 2014). From the crystal structures, the gate region can be determined to measure 8Å in length, spanning from just below L340-N341 on the extracellular side to L346-A347 (zfP2X4) on the intracellular side. SCAM studies were also able to suggest a reorganization of the transmembrane domain, which likely involves extensive repacking and motions of both TM helices. Application of ivermectin (IVM), an allosteric modulator of selected P2X

receptors, to mutants obtained by tryptophan scanning mutagenesis provided preliminary information about changes occurring in the interactions of TM1 and TM2 residues during gating, and the results led to the hypothesis that TM1 may rotate relative to TM2 (Silberberg et al., 2007). Following single channel recordings of TM2 mutants, Cao *et al*. suggested a counter-clockwise rotation of several tens of degrees and separation of the TM2 helices (Cao et al., 2009). Structural constraints obtained from functional studies predicted conformational rearrangements. The expansion of TM1 and TM2 in the extracellular side was suggested by the inhibition of channel opening resulting from disulfide bond formation between V48C and I328C (rP2X2) (Jiang et al., 2003). In addition, by engineering metal bridges Li *et al*. proposed that the TM2 helix does not undergo large rotations, but instead, a relative straightening of TM2 occurs during gating, suggesting that the inner part of the TM2 domain must move toward the central axis of the pore during gating (Li et al., 2010). Moreover, using concatemeric channels carrying one, two or three T339K mutations, Browne *et al*. demonstrated that each subunit contributes symmetrically to the opening of the pore (Browne et al., 2011). From the crystal structures, it can be observed that TM1 and TM2 rotate by ~10° and ~55°, respectively, counterclockwise about the central pore axis, perpendicular to the membrane plane, and increase their tilt angle by ~8° and ~2°, respectively, about an axis parallel to the membrane plane. This implies an iris-like movement, which leads to the opening of a 7Å-wide pore. However, the large distance separating residues V343 or D349 is not compatible with data from metal bridge experiments in the inner section of the channel, which indicated that these residues should be found in close proximity to one another.

Furthermore, the structure revealed unexpectedly large intersubunit crevices within the transmembrane domain (Figure 1A). The physiological relevance of these gaps remains unclear, but recent molecular dynamic simulations performed with the open state structure

indicated that lipids may diffuse into these gaps, thereby blocking the pore, suggesting that these crevices are inconsistent with ion conduction (Heymann et al., 2013).

The lack of cytosolic domain, which was truncated for crystallogenic purposes, may cause the local destabilization of the structure, as well as the absence of intersubunit interactions. A recent study proposes an improved model of the channel in the open state, generated by small rotations and a translation of TM2 toward the central axis, which decreases the size of the crevices and brings the intracellular ends of the TM helices closer together, narrowing the gaps between them. This new packing model restores intersubunit interactions between TM2 helices including the metal bridge formed at the threefold axis by V343C (rP2X2), and intrasubunit interactions between TM2 and TM1 helices (Heymann et al., 2013). These data combined suggest that the crystal structure most likely does not represent a native, functional open state.

4. Allosteric modulation of P2X receptors

There are many allosteric modulators that regulate P2X function. These modulators can be as small as protons, metals or larger molecules such as IVM, neurosteroids, phospholipids and kinases (Coddou et al., 2011a; Coddou et al., 2011b; Evans, 2009). Here, we will consider only three examples of allosteric modulators that act on three different loci: the ectodomain, transmembrane domain and intracellular domain. The reader is referred to other extensive reviews for further details (Coddou et al., 2011a; Coddou et al., 2011b; Evans, 2009; Huidobro-Toro et al., 2008).

4.1. Allosteric regulation within the ectodomain: The case of zinc

Zinc is the second most abundant trace metal in the body after iron and consistently plays a major role in enzymatic reactions (Huidobro-Toro et al., 2008). In the blood plasma,

the concentrations of trace metals including zinc reach 15 μM, and in the brain, zinc concentrations are as high as 100 to 150 μM. Zinc is co-released with neurotransmitters at some synapses and can act on several post-synaptic targets such as LGICs to modulate neuronal activity (reviewed in (Huidobro-Toro et al., 2008; Sensi et al., 2009)).

Extracellular zinc modulates the function of some P2X receptors. It has a biphasic allosteric modulatory effect: at low concentrations (under 100 μM), pre-incubation with zinc has a potentiating effect on ionic currents flowing through rP2X2, rP2X3, rP2X4 and rP2X5 receptors, whereas at higher concentrations, in the millimolar range, zinc mainly has an inhibitory effect (Coddou et al., 2011b; Wildman et al., 2002; Wildman et al., 1998, 1999a, b). In rP2X1 and rP2X7 receptors, zinc exerts a purely concentration-dependent inhibitory effect (Acuna-Castillo et al., 2007; Wildman et al., 2002; Wildman et al., 1999b). The inhibitory allosteric effect is dependent upon a pre-incubation period, especially for rP2X2, rP2X3 and rP2X1.

The biphasic effect has been interpreted as a result of the existence of at least two distinct allosteric sites for zinc, one with a high affinity responsible for the potentiating effect and one with a low affinity involved in the inhibitory control of P2X receptors (Coddou et al., 2011b). Site-directed mutagenesis has been used to solve the role of specific amino acid residues involved in these modulatory effects. It has been observed that the residues H120 and H213 participate primarily to the allosteric metal binding site of rP2X2 receptor responsible for the potentiating effect of zinc (Clyne et al., 2002; Lorca et al., 2005; Nagaya et al., 2005; Tittle et al., 2007). In contrast to the potentiating effect observed on the rat P2X2, zinc inhibits the human P2X2 receptor activity with an IC_{50} in the micromolar range (Tittle and Hume, 2008), highlighting striking opposite effects between rodents and humans. Analysis of the sequences indicated that only one of the two histidines essential for zinc potentiation in rP2X2 is present at the homologous position to rat H120 in hP2X2 (H132), with the position

homologous to rat H213 instead having an arginine (R225). As zinc is likely coordinated directly by the two histidines in rodents, its ability to make such an interaction is abolished in humans because of the presence of the positively charged arginine residue. Notably, mutating R225 to cysteine was sufficient to confer zinc potentiation onto the human orthologue (Tittle and Hume, 2008), suggesting that zinc potentiation uses the same mechanism as that in the wild-type rP2X2 receptor. In the crystal structures, residues homologous to H120 and H213 belong to two adjacent subunits and are located, respectively, in the head and dorsal fin domains (**Figure 3A and B**), positions which corresponds to the two 'lips' of the ATP-binding jaw. In agreement with previous works (Jiang et al., 2012a) and with the recent crystal structure solved in the presence of ATP (Hattori and Gouaux, 2012), ATP binding promotes tightening of the two lips of the binding jaw and zinc stabilizes the conformation of closed jaws through coordination of the two histidine residues (**Figure 3B**).

In addition, other histidines (H192 and H245) from rP2X2 were also identified as potentially participating to the allosteric potentiating effect of zinc, although to a lesser extent than H120 and H213 (Lorca et al., 2005). However, mapping of the equivalent residues in the crystal structure shows that these residues are not close to each other and are far away from the established potentiating site involving H120 and H213 (**Figure 3A and B**). The mechanisms of potentiation involving H192 and H245 thus remain to be clarified.

The location of the zinc inhibition sites also remains unclear. In rP2X2, neither the extracellular histidines nor glutamates or aspartates are required for low affinity zinc inhibition (Clyne et al., 2002; Friday and Hume, 2008). By contrast, mutating H204 and H209 to alanine in the hP2X2 receptor has been shown to significantly reduce zinc inhibition, and mutating to cysteine restored wild-type inhibition (Tittle and Hume, 2008). However, the fact that the double alanine mutant was no more deficient than either single mutant, along with the fact that MTS reagents carrying opposite charges were nearly equipotent in affecting zinc

effects in cysteine mutants, suggest that H204 and H209 are not directly involved in zinc inhibition. Additional experiments are thus needed to identify formally residues responsible for zinc inhibition.

Additional residues from other P2X subtypes have been identified to be critically involved in zinc allosteric effects. For instance, in rP2X4 receptor, the residue C132 is involved in the potentiating allosteric effect of zinc, whereas D138 and H140 have been determined to participate in the inhibitory allosteric effect of zinc (Coddou et al., 2007). In rP2X7 receptor, the inhibitory effect of zinc was abolished in H219A and H267A mutants, suggesting a major role of these two amino acids (Acuna-Castillo et al., 2007). As these residues are not conserved among P2X subtypes, these data suggest that P2X7 has undergone a separate adaptation to trace metal coordination (Huidobro-Toro et al., 2008).

4.2 Allosteric regulation within the transmembrane domains: the case of ivermectin

Ivermectin (IVM) is semi-synthetic macrocyclic lactone used as an antiparasitic in humans and animals (Silberberg et al., 2007). It is a positive allosteric modulator of P2X4 receptors from several different species (Agboh et al., 2004; Khakh et al., 1999b; Priel and Silberberg, 2004) as well as the human P2X7 receptor, but not murine P2X7 receptor (Norenberg et al., 2012). It acts only when applied from the extracellular side of the cell membrane but not from the inside, suggesting that it does not bind to intracellular domains (Norenberg et al., 2012; Priel and Silberberg, 2004). Consistent with its lipophilic character, the effects of IVM are slow to develop, suggesting that it might need first to partition into the membrane before reaching its binding sites, which are likely close to the extracellular face of the membrane. A detailed kinetic analysis suggested that IVM binds to separate sites in hP2X4 receptors. Binding to the higher affinity site increases current amplitude by reducing channel desensitization, whilst binding to the lower affinity site slows the deactivation of the

current mainly by stabilizing the open channel state (Priel and Silberberg, 2004). Chimeras made between IVM-sensitive P2X4 receptor and IVM-insensitive P2X2 receptors first confirmed the critical role of the transmembrane domain. It has been initially found that chimeras of the ectodomain of P2X4 with helices and intracellular domains of P2X2 are not sensitive to IVM (Jelinkova et al., 2006). In contrast, chimeras of the two transmembrane segments of P2X4 receptor into P2X2 receptor are sufficient to confer IVM sensitivity (Silberberg et al., 2007), indicating a major role of both transmembrane segments of P2X4R in the positive allosteric effect of the molecule. Consistent with a transmembrane location, site-directed mutagenesis analysis of residues located in the putative TM domains (Jelinkova et al., 2008; Popova et al., 2013; Silberberg et al., 2007) indicated that V28, Q36, I39, L40, Y42, V43, V47, W50 (TM1) and N338, G340, G342, L345, L346, V348, A349, I356 (TM2) are involved in IVM sensitivity of the channel (Jelinkova et al., 2008; Silberberg et al., 2007). A recent study confirmed the importance of some of these residues (L40, V43, V47 and W50) in the effect of IVM on deactivation in rP2X4, and further identified new ones (W46, G53, F330, D331, I332 and I337) (Zemkova et al., 2015). The mutation to tryptophan of the homologous residues of Y42 and V43 in human P2X4 receptor also reduced the allosteric effect of IVM (Samways et al., 2012). Although these results do not firmly demonstrate that these residues contribute directly to IVM binding sites, they support the conclusion that these residues are critically involved in the functional effect of IVM. Interestingly, mapping of the corresponding residues in the zfP2X4 crystal structure bound to ATP reveals that most of them are located on the putative transmembrane helices at the subunit interfaces, with their side chains facing one another (**Figure 3C**). This suggests that IVM may indeed bind to these interfaces.

In support of this hypothesis, mutations of the amino acid W46 to other aromatic residues (tyrosine or phenylalanine) in heterologously expressed rP2X4 receptor did not

modify IVM-induced potentiation of ATP-dependent currents, whereas substitution with non-aromatic residues (leucine, valine, alanine, asparagine, lysine or aspartate) switched the potentiation to inhibition (Popova et al., 2013). Therefore, it has been suggested that the presence of an aromatic group at position 46 is a critical determinant of IVM-induced allosteric effects, most probably by means of a cation-π interaction (Popova et al., 2013). It was previously suggested that the interaction between W46 and M336 participates to a binding pocket for IVM (Asatryan et al., 2010). However, whilst both individual W46A and M336A mutations as well as the double mutation significantly reduced the inhibitory effect of ethanol, only the mutation W46A (or the combined mutation) modified the positive allosteric effect of IVM (Popova et al., 2013). Finally, the analysis of a new molecular model based on the open pore conformation of zfP2X4 suggested a prominent role of the amino acid Y42 of rP2X4 receptor, confirmed by the mutation Y42F which also switched the potentiating allosteric effect of IVM to inhibition (Popova et al., 2013). This is probably due to the lack of a hydrogen bond between IVM and the phenolic OH group of Y42 in the mutation. Interestingly, in another study, the mutation Y42A of rP2X4 receptor mimicked the allosteric action of IVM by decreasing the deactivation rate of the current (Zemkova et al., 2015). It has also been shown that removing of the fixed negative charge of the acidic amino acid E51 of hP2X4 receptor, by the mutation E51Q, markedly reduces the allosteric effect of IVM on current intensity and relative permeability to Ca^{2+} (Samways et al., 2012). As this amino acid is located at the lateral entrance to the transmembrane pore, it has been hypothesized that IVM may change the topology of these lateral portals (Samways et al., 2012).

In agreement with this hypothesis, the allosteric effect of IVM on current deactivation was significantly attenuated by the mutation of F198 and F200, two residues located in the fenestrations (**Figure 3C**), whereas the effect was increased by the mutation F330A/S, another amino acid of the region (Gao et al., 2015).

Finally, a recent work investigated the role of IVM on P2X pore dilation (Zemkova et al., 2015). In this study, the influence of IVM on pore dilation was studied in both wild-type rP2X4 receptor and transmembrane domain receptor mutants. IVM-induced receptor dilation in the presence of ATP was reduced or lost in L40A, V43A, W46A, V47A, W50A, G53A, F330A, D331A, I332A, I333A and I337A mutants (Zemkova et al., 2015). The results established that the IVM-induced rescue of rP2X4 receptor from desensitization temporally coincides with pore dilation.

Altogether, these data highlight the notion that there are multiple sites of interaction for IVM in P2X4 receptors (Popova et al., 2013). IVM binding sites are believed to be close to the lateral fenestrations found at the membrane interface (Gao et al., 2015; Jiang et al., 2013). It is thus tempting to speculate that IVM acts by insertion between adjacent transmembrane helices, which are located just below these fenestrations, perhaps by slightly moving apart adjacent helices (**Figure 3C**). This mechanism would be consistent with the slight increase of single-channel conductance observed for the lower affinity site and with the slow onset and washout of the effects of IVM (Priel and Silberberg, 2004). Crystal structures of IVM bound to the receptor in the presence of ATP would definitively resolve this issue.

4.3 Allosteric regulation within the intracellular C-terminus domain: the regulatory effects of phospholipids

The particular allosteric regulation exerted by phospholipids at the carboxy terminal is considered as a post-translational mechanism of regulation of P2X receptor activity. The effects of phosphoinositides (PIPn) on P2X receptors have been reviewed recently (Bernier et al., 2013). PIPn increase P2X currents, most likely through a conformational change of the receptor, leading to an alteration of the gating (Bernier et al., 2013).

There are several important features in the regulatory effect exerted by PIPn on P2X receptors which have been mostly revealed by functional assays using the patch-clamp technique and/or by the binding of GST-fusion proteins containing the C-terminal domains of P2X receptors to PIPn coated on nitrocellulose membranes (PIP strip assays) (Bernier et al., 2013). From these studies, it has been shown that PIPn exerts a direct effect on P2X1, P2X2 and P2X4 receptors as well as on the hetermomeric P2X1/5 and P2X2/3 receptors (Bernier et al., 2008a; Bernier et al., 2008b; Bernier et al., 2012; Fujiwara and Kubo, 2006). These studies further identified a dual polybasic cluster motif in the C-terminal region of certain P2X subtypes, in which positively charged residues such as K359 and K364 in rP2X1 (Bernier et al., 2008b), K365 and K369 in rP2X2 (Fujiwara and Kubo, 2006) and K362, K363, K370 and K371 in P2X4 (Bernier et al., 2008a; Bernier et al., 2012) play a major role in the binding of PIPn. These adjacent polybasic amino acid clusters, with a net positive charge, are assumed to electrostatically interact with PIPn, which are anionic phospholipids (Bernier et al., 2012). These clusters are located close to the plasma membrane (3 residues from TM2 in the cytosolic region of the C terminal) in close vicinity to the negative phosphate head groups of PIPn in the membrane (Bernier et al., 2012).

The two polybasic clusters are not completely conserved among P2X receptors; in particular, this microdomain is lacking in P2X3, P2X5 and P2X7 subunits. Therefore, these subunits do not directly interact with PIPn (Bernier et al., 2012). However, it has been shown that P2X3 and P2X7 are functionally modulated by PIPn, suggesting that an indirect regulation mechanism must take place for these receptors (Bernier et al., 2012; Zhao et al., 2007). Furthermore, mammalian P2X5 receptors are not sensitive to PIPn regulation (Ase et al., 2010), but negative-to-positive mutations in the twin clusters were sufficient to confer PIPn-binding and positive regulatory effect on the engineered receptor (Bernier et al., 2012). The identification of the three-dimensional location of these residues is hindered by the lack

of intracellular domain structure. Determination of the structure of a full-length receptor, including the intracellular domain, will, therefore, certainly advance in atomic detail the precise molecular mechanism underlying PIPn allosteric regulation.

5. Optogating of P2X receptors

It is clear that a combination of the previously discussed studies, using a range of techniques and methods, has been able to advance our understanding of the molecular structure of P2X receptors and its relationship to their function. And yet, despite the numerous important discoveries made over the years, there are many aspects of P2X structure and function which remain unclear, in particular, the precise mechanism of the gating process and the implications of gating at a cellular level. Progress in these areas is hindered by a lack of pharmacological tools which can be implemented for more in-depth study.

However, new approaches based on optogenetic pharmacology principles may offer innovative, alternative ways of probing the structure and function of these ion channels. Optogenetic pharmacology, which involves the use of a synthetic photoisomerisable ligand covalently attached to a genetically tagged ion channel, has given rise to a number of strategies which allow light-controlled gating of LGICs, such as nAChRs (Tochitsky et al., 2012), $GABA_A$ receptor (Lin et al., 2014) and iGluR6 (Volgraf et al., 2006). Azobenzene-containing reagents are typically employed, as the azobenzene group is well characterised in its photoisomerisation behaviour - isomerisation from *trans* to *cis* occurs upon irradiation of a particular wavelength, λ_1, and irradiation at a different wavelength, λ_2, or alternatively thermal relaxation, leads to isomerisation back to the thermodynamically favoured *trans* isomer (**Figure 4A**). The azobenzene group also offers a number of advantages for biological applications (Mourot et al., 2013): *cis – trans* isomerisation takes place on the picosecond scale, causes a significant change in geometry of the molecule, and the absorption spectra of

the two isomers are sufficiently different to ensure that only one isomer is mostly (but rarely completely) obtained upon irradiation at the required wavelength. Using light as a stimulus for ion channel activation is particularly attractive, as it can be applied with high spatial and temporal precision, and is considered as an orthogonal stimulus unable to trigger other biological processes. Recently, several strategies have also been developed to allow light-controlled gating of P2X receptors.

The first of these is the optogating method, developed by Lemoine *et al* in 2013. This strategy uses P2X2 receptors carrying a genetically encoded cysteine residue in the TM domain, to which is covalently tethered the photoswitchable reagent. In this case, the photoswitch employed is MEA-TMA, comprising a maleimide moiety for tethering to the cysteine, the central azobenzene segment and a positively charged trimethyl ammonium extremity, vital for efficient labelling (**Figure 4B**). Irradiation in the visible or near UV region of light, causes the tethered MEA-TMA to undergo isomerisation to the *trans* or *cis* isomer respectively, which in turn induces an opening or closing of the channel (**Figure 4C**) (Lemoine et al., 2013). The exact mechanism of optogating remains unknown, but it can be reasonably assumed that the movement involved in this isomerisation process causes a change in the interactions between TM helices, resulting in the gating of the channel (**Figure 4B**).

Depending on the exact position at which the tethering cysteine is introduced, the channel may be opened by the molecule in the *cis* or *trans* isomer, giving rise to "cis-opener" and "trans-opener" positions. The position found to offer the most robust and stable light-induced currents is I328C, a trans-opener (**Figure 4C**).

An important characteristic of this system is the bistability of the bound MEA-TMA, which ensures a stable photoactivation, sustained in the absence of irradiation. As shown in **Figure 4C**, optogated currents induced by isomerisation to the *trans* isomer following irradiation at 525 nm remain stable even when irradiation is ceased and the system left in the

dark over the course of 20 seconds. Only upon irradiation at 365 nm and isomerisation back to the *cis* isomer is a closing of the channel observed. This is particularly pertinent property when considering the possible extension of optogating to *in vivo* systems, as it means that only a transient irradiation would be required, therefore limiting any photodamage to the surrounding tissue.

A second method for achieving light-controlled P2X gating was developed by Browne *et al.* This strategy, whilst similar to optogating in the choice of an azobenzene compound, BMA, as the photoswitch, differs in that the photoswitch contains two maleimide moieties at the extremities and is thus able to cross-link to two anchoring points of the receptor complex, on different subunits (**Figure 4B**). A mechanism of light-induced activation different to that of optogating is therefore at play, whereby light controlled toggling between *cis* and *trans* BMA isomers acts to brings the subunits closer or further apart, thus closing or opening the channel (Browne et al., 2014). Of note, is that this method has been developed using the tethering position P329C, just one residue down from I328C, the position for which the most robust light-gated currents were observed with the optogating strategy (**Figure 4D**). This area, located toward the upper end of the TM2 helix, may therefore represent a point in the channel region particularly effective for manipulating the molecular motions involved in channel opening.

As the photoswitches employed here are intrinsically devoid of pharmacological activity, there is the possibility to extend these strategies not only to other P2X variants, but also to other LGICs, offering a flexibility over previously developed optogenetic pharmacology based methods, where photoswitches must feature a pharmacologically active ligand (agonist, antagonist or allosteric modulator) specific for each receptor in question. This has been demonstrated with the BMA system, shown to control gating in P2X3, P2X2/3 heteromers as well as the structurally related ASIC1a channel. Both strategies have also been

successfully implemented in P2X2 channels carrying the K69A mutation (Browne et al., 2014; Lemoine et al., 2013), which are known to be rendered unresponsive to their endogenous ligand ATP (Jiang et al., 2000). These systems therefore present the opportunity to study P2X receptors with an exquisite spatiotemporal control, where the only channel activity observed originates from the application of light.

It would be desirable to extend these strategies further, in particular, to the P2X4 and P2X7 subtypes, which have been found to play an important role in a number of disorders such as neuropathic pain (Beggs et al., 2012) and chronic inflammation (Di Virgilio and Vuerich, 2015). An eventual goal which can be envisaged for this work would be the development of systems suitable for use *in vivo*, allowing elucidation of the precise pathological contribution of P2X activation in models of such diseases.

Conclusion

In this review, we provided a summary of functional and structural studies on P2X receptors. If the determination of X-ray structures provided an unprecedented insight into the understanding of the molecular operation of P2X receptors, there are still many questions which are left unanswered. In particular, what is the structure of the intracellular domain and how does it contribute to the function of the receptor? How do the various allosteric modulators regulate the response to ATP? What are the mechanisms of allosteric transition? And how may the pore dynamically change its permeability to cations? Elucidation of the answers to these intriguing questions will better define the functional role of P2X receptors in normal and pathological states.

References

Acuna-Castillo, C., Coddou, C., Bull, P., Brito, J., Huidobro-Toro, J. P., 2007. Differential role of extracellular histidines in copper, zinc, magnesium and proton modulation of the P2X7 purinergic receptor. J Neurochem 101, 17-26.

Adriouch, S., Bannas, P., Schwarz, N., Fliegert, R., Guse, A. H., Seman, M., Haag, F., Koch-Nolte, F., 2008. ADP-ribosylation at R125 gates the P2X7 ion channel by presenting a covalent ligand to its nucleotide binding site. FASEB J 22, 861-869.

Agboh, K. C., Webb, T. E., Evans, R. J., Ennion, S. J., 2004. Functional characterization of a P2X receptor from Schistosoma mansoni. J Biol Chem 279, 41650-41657.

Allsopp, R. C., El Ajouz, S., Schmid, R., Evans, R. J., 2011. Cysteine scanning mutagenesis (residues Glu52-Gly96) of the human P2X1 receptor for ATP: mapping agonist binding and channel gating. J Biol Chem 286, 29207-29217.

Asatryan, L., Popova, M., Perkins, D., Trudell, J. R., Alkana, R. L., Davies, D. L., 2010. Ivermectin antagonizes ethanol inhibition in purinergic P2X4 receptors. J Pharmacol Exp Ther 334, 720-728.

Ase, A. R., Bernier, L. P., Blais, D., Pankratov, Y., Seguela, P., 2010. Modulation of heteromeric P2X1/5 receptors by phosphoinositides in astrocytes depends on the P2X1 subunit. J Neurochem 113, 1676-1684.

Bardoni, R., Goldstein, P. A., Lee, C. J., Gu, J. G., MacDermott, A. B., 1997. ATP P2X receptors mediate fast synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord. J Neurosci 17, 5297-5304.

Barrera, N. P., Ormond, S. J., Henderson, R. M., Murrell-Lagnado, R. D., Edwardson, J. M., 2005. Atomic force microscopy imaging demonstrates that P2X2 receptors are trimers but that P2X6 receptor subunits do not oligomerize. J Biol Chem 280, 10759-10765.

Beggs, S., Trang, T., Salter, M. W., 2012. P2X4R+ microglia drive neuropathic pain. Nat Neurosci 15, 1068-1073.

Bernier, L. P., Ase, A. R., Chevallier, S., Blais, D., Zhao, Q., Boue-Grabot, E., Logothetis, D., Seguela, P., 2008a. Phosphoinositides regulate P2X4 ATP-gated channels through direct interactions. J Neurosci 28, 12938-12945.

Bernier, L. P., Ase, A. R., Seguela, P., 2013. Post-translational regulation of P2X receptor channels: modulation by phospholipids. Front Cell Neurosci 7, 226.

Bernier, L. P., Ase, A. R., Tong, X., Hamel, E., Blais, D., Zhao, Q., Logothetis, D. E., Seguela, P., 2008b. Direct modulation of P2X1 receptor-channels by the lipid phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. Mol Pharmacol 74, 785-792.

Bernier, L. P., Blais, D., Boue-Grabot, E., Seguela, P., 2012. A dual polybasic motif determines phosphoinositide binding and regulation in the P2X channel family. PLoS One 7, e40595.

Bhargava, Y., Rettinger, J., Mourot, A., 2012. Allosteric nature of P2X receptor activation probed by photoaffinity labelling. Br J Pharmacol 167, 1301-1310.

Brake, A. J., Wagenbach, M. J., Julius, D., 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature 371, 519-523.

Browne, L. E., Cao, L., Broomhead, H. E., Bragg, L., Wilkinson, W. J., North, R. A., 2011. P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. Nat Neurosci 14, 17-18.

Browne, L. E., North, R. A., 2013. P2X receptor intermediate activation states have altered nucleotide selectivity. J Neurosci 33, 14801-14808.

Browne, L. E., Nunes, J. P., Sim, J. A., Chudasama, V., Bragg, L., Caddick, S., North, R. A., 2014. Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. Proc Natl Acad Sci U S A 111, 521-526.

Burnstock, G., 1972. Purinergic nerves. Pharmacol Rev 24, 509-581.

Burnstock, G., 2006. Historical review: ATP as a neurotransmitter. Trends Pharmacol Sci 27, 166-176.

Cao, L., Broomhead, H. E., Young, M. T., North, R. A., 2009. Polar residues in the second transmembrane domain of the rat P2X2 receptor that affect spontaneous gating, unitary conductance, and rectification. J Neurosci 29, 14257-14264.

Cao, L., Young, M. T., Broomhead, H. E., Fountain, S. J., North, R. A., 2007. Thr339-to-serine substitution in rat P2X2 receptor second transmembrane domain causes constitutive opening and indicates a gating role for Lys308. J Neurosci 27, 12916-12923.

Chataigneau, T., Lemoine, D., Grutter, T., 2013. Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. Front Cell Neurosci 7, 273.

Clyne, J. D., LaPointe, L. D., Hume, R. I., 2002. The role of histidine residues in modulation of the rat P2X(2) purinoceptor by zinc and pH. J Physiol 539, 347-359.

Coddou, C., Acuna-Castillo, C., Bull, P., Huidobro-Toro, J. P., 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. J Biol Chem 282, 36879-36886.

Coddou, C., Stojilkovic, S. S., Huidobro-Toro, J. P., 2011a. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. Rev Neurosci 22, 335-354.

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J. P., Stojilkovic, S. S., 2011b. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. Pharmacol Rev 63, 641-683.

Di Virgilio, F., Vuerich, M., 2015. Purinergic signaling in the immune system. Auton Neurosci.

Ding, S., Sachs, F., 1999. Ion permeation and block of P2X(2) purinoceptors: single channel recordings. J Membr Biol 172, 215-223.

Du, J., Dong, H., Zhou, H. X., 2012. Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 4140-4145.

Egan, T. M., Khakh, B. S., 2004. Contribution of calcium ions to P2X channel responses. J Neurosci 24, 3413-3420.

El-Ajouz, S., Ray, D., Allsopp, R. C., Evans, R. J., 2012. Molecular basis of selective antagonism of the P2X1 receptor for ATP by NF449 and suramin: contribution of basic amino acids in the cysteine-rich loop. Br J Pharmacol 165, 390-400.

Ennion, S., Hagan, S., Evans, R. J., 2000. The role of positively charged amino acids in ATP recognition by human P2X(1) receptors. J Biol Chem 275, 29361-29367.

Evans, R. J., 2009. Orthosteric and allosteric binding sites of P2X receptors. Eur Biophys J 38, 319-327.

Fischer, W., Zadori, Z., Kullnick, Y., Groger-Arndt, H., Franke, H., Wirkner, K., Illes, P., Mager, P. P., 2007. Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding. Eur J Pharmacol 576, 7-17.

Friday, S. C., Hume, R. I., 2008. Contribution of extracellular negatively charged residues to ATP action and zinc modulation of rat P2X2 receptors. J Neurochem 105, 1264-1275.

Fujiwara, Y., Kubo, Y., 2006. Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X2 channels by phosphoinositides. J Physiol 576, 135-149.

Gao, C., Yu, Q., Xu, H., Zhang, L., Liu, J., Jie, Y., Ma, W., Samways, D. S., Li, Z., 2015. Roles of the lateral fenestration residues of the P2X4 receptor that contribute to the channel function and the deactivation effect of ivermectin. Purinergic Signal 11, 229-238.

Giniatullin, R., Nistri, A., 2013. Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling. Front Cell Neurosci 7, 245.

Hattori, M., Gouaux, E., 2012. Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. Nature 485, 207-212.

Hausmann, R., Gunther, J., Kless, A., Kuhlmann, D., Kassack, M. U., Bahrenberg, G., Markwardt, F., Schmalzing, G., 2013. Salt bridge switching from Arg290/Glu167 to Arg290/ATP promotes the closed-to-open transition of the P2X2 receptor. Mol Pharmacol 83, 73-84.

Hausmann, R., Kless, A., Schmalzing, G., 2015. Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. Curr Med Chem 22, 799-818.

Heymann, G., Dai, J., Li, M., Silberberg, S. D., Zhou, H. X., Swartz, K. J., 2013. Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. Proc Natl Acad Sci U S A 110, E4045-4054.

Huang, L. D., Fan, Y. Z., Tian, Y., Yang, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhao, W. S., Zhou, W. C., Cheng, X. Y., Cao, P., Lu, X. Y., Yu, Y., 2014. Inherent dynamics of head domain correlates with ATP-recognition of P2X4 receptors: insights gained from molecular simulations. PLoS One 9, e97528.

Huidobro-Toro, J. P., Lorca, R. A., Coddou, C., 2008. Trace metals in the brain: allosteric modulators of ligand-gated receptor channels, the case of ATP-gated P2X receptors. Eur Biophys J 37, 301-314.

Idzko, M., Ferrari, D., Eltzschig, H. K., 2014. Nucleotide signalling during inflammation. Nature 509, 310-317.

Jelinkova, I., Vavra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H. W., Zemkova, H., Stojilkovic, S. S., 2008. Identification of P2X(4) receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. Pflugers Arch 456, 939-950.

Jelinkova, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S. S., Zemkova, H., 2006. Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. Biochem Biophys Res Commun 349, 619-625.

Jiang, L. H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., North, R. A., 2003. Subunit arrangement in P2X receptors. J Neurosci 23, 8903-8910.

Jiang, L. H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., North, R. A., 2001. Amino acid residues involved in gating identified in the first membrane-spanning domain of the rat P2X(2) receptor. J Biol Chem 276, 14902-14908.

Jiang, L. H., Rassendren, F., Surprenant, A., North, R. A., 2000. Identification of amino acid residues contributing to the ATP-binding site of a purinergic P2X receptor. J Biol Chem 275, 34190-34196.

Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Prado de Carvalho, L., Specht, A., Grutter, T., 2011. Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 9066-9071.

Jiang, R., Martz, A., Gonin, S., Taly, A., de Carvalho, L. P., Grutter, T., 2010. A putative extracellular salt bridge at the subunit interface contributes to the ion channel function of the ATP-gated P2X2 receptor. J Biol Chem 285, 15805-15815.

Jiang, R., Taly, A., Grutter, T., 2013. Moving through the gate in ATP-activated P2X receptors. Trends Biochem Sci 38, 20-29.

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. EMBO J 31, 2134-2143.

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) 6, 398-402.

Kawate, T., Michel, J. C., Birdsong, W. T., Gouaux, E., 2009. Crystal structure of the ATP-gated P2X(4) ion channel in the closed state. Nature 460, 592-598.

Kawate, T., Robertson, J. L., Li, M., Silberberg, S. D., Swartz, K. J., 2011. Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. J Gen Physiol 137, 579-590.

Khakh, B. S., Bao, X. R., Labarca, C., Lester, H. A., 1999a. Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. Nat Neurosci 2, 322-330.

Khakh, B. S., North, R. A., 2012. Neuromodulation by extracellular ATP and P2X receptors in the CNS. Neuron 76, 51-69.

Khakh, B. S., Proctor, W. R., Dunwiddie, T. V., Labarca, C., Lester, H. A., 1999b. Allosteric control of gating and kinetics at P2X(4) receptor channels. J Neurosci 19, 7289-7299.

Kinnamon, S. C., Finger, T. E., 2013. A taste for ATP: neurotransmission in taste buds. Front Cell Neurosci 7, 264.

Kowalski, M., Hausmann, R., Dopychai, A., Grohmann, M., Franke, H., Nieber, K., Schmalzing, G., Illes, P., Riedel, T., 2014. Conformational flexibility of the agonist binding

jaw of the human P2X3 receptor is a prerequisite for channel opening. Br J Pharmacol 171, 5093-5112.

Lalo, U., Verkhratsky, A., Burnstock, G., Pankratov, Y., 2012. P2X receptor-mediated synaptic transmission. WIREs Membr Transp Signal 1, 297-309.

Lemoine, D., Habermacher, C., Martz, A., Mery, P. F., Bouquier, N., Diverchy, F., Taly, A., Rassendren, F., Specht, A., Grutter, T., 2013. Optical control of an ion channel gate. Proc Natl Acad Sci U S A 110, 20813-20818.

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. Chem Rev 112, 6285-6318.

Li, M., Chang, T. H., Silberberg, S. D., Swartz, K. J., 2008. Gating the pore of P2X receptor channels. Nat Neurosci 11, 883-887.

Li, M., Kawate, T., Silberberg, S. D., Swartz, K. J., 2010. Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. Nat Commun 1, 44.

Li, Z., Migita, K., Samways, D. S., Voigt, M. M., Egan, T. M., 2004. Gain and loss of channel function by alanine substitutions in the transmembrane segments of the rat ATP-gated P2X2 receptor. J Neurosci 24, 7378-7386.

Lin, W. C., Davenport, C. M., Mourot, A., Vytla, D., Smith, C. M., Medeiros, K. A., Chambers, J. J., Kramer, R. H., 2014. Engineering a light-regulated GABAA receptor for optical control of neural inhibition. ACS Chem Biol 9, 1414-1419.

Lorca, R. A., Coddou, C., Gazitua, M. C., Bull, P., Arredondo, C., Huidobro-Toro, J. P., 2005. Extracellular histidine residues identify common structural determinants in the copper/zinc P2X2 receptor modulation. J Neurochem 95, 499-512.

Lorinczi, E., Bhargava, Y., Marino, S. F., Taly, A., Kaczmarek-Hajek, K., Barrantes-Freer, A., Dutertre, S., Grutter, T., Rettinger, J., Nicke, A., 2012. Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 11396-11401.

Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Nicke, A., 2009. Inter-subunit disulfide cross-linking in homomeric and heteromeric P2X receptors. Eur Biophys J 38, 329-338.

Michel, A. D., Clay, W. C., Ng, S. W., Roman, S., Thompson, K., Condreay, J. P., Hall, M., Holbrook, J., Livermore, D., Senger, S., 2008. Identification of regions of the P2X(7) receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. Br J Pharmacol 155, 738-751.

Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., Sato, C., 2005. Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. Biochem Biophys Res Commun 337, 998-1005.

Mio, K., Ogura, T., Yamamoto, T., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Kubo, Y., Sato, C., 2009. Reconstruction of the P2X(2) receptor reveals a vase-shaped structure with lateral tunnels above the membrane. Structure 17, 266-275.

Moffatt, L., Hume, R. I., 2007. Responses of rat P2X2 receptors to ultrashort pulses of ATP provide insights into ATP binding and channel gating. J Gen Physiol 130, 183-201.

Mourot, A., Tochitsky, I., Kramer, R. H., 2013. Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. Front Mol Neurosci 6, 5.

Nagaya, N., Tittle, R. K., Saar, N., Dellal, S. S., Hume, R. I., 2005. An intersubunit zinc binding site in rat P2X2 receptors. J Biol Chem 280, 25982-25993.

Nakazawa, K., Yamakoshi, Y., Tsuchiya, T., Ohno, Y., 2005. Purification and aqueous phase atomic force microscopic observation of recombinant P2X2 receptor. Eur J Pharmacol 518, 107-110.

Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R. A., Buell, G., Rassendren, F., 1998. Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). J Biol Chem 273, 15177-15182.

Nicke, A., Baumert, H. G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., Schmalzing, G., 1998. P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. EMBO J 17, 3016-3028.

Norenberg, W., Sobottka, H., Hempel, C., Plotz, T., Fischer, W., Schmalzing, G., Schaefer, M., 2012. Positive allosteric modulation by ivermectin of human but not murine P2X7 receptors. Br J Pharmacol 167, 48-66.

North, R. A., 2002. Molecular physiology of P2X receptors. Physiol Rev 82, 1013-1067.

North, R. A., Jarvis, M. F., 2013. P2X receptors as drug targets. Mol Pharmacol 83, 759-769.

Popova, M., Trudell, J., Li, K., Alkana, R., Davies, D., Asatryan, L., 2013. Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. Purinergic Signal 9, 621-632.

Priel, A., Silberberg, S. D., 2004. Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. J Gen Physiol 123, 281-293.

Roberts, J. A., Allsopp, R. C., El Ajouz, S., Vial, C., Schmid, R., Young, M. T., Evans, R. J., 2012. Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 4663-4667.

Roberts, J. A., Digby, H. R., Kara, M., El Ajouz, S., Sutcliffe, M. J., Evans, R. J., 2008. Cysteine substitution mutagenesis and the effects of methanethiosulfonate reagents at P2X2 and P2X4 receptors support a core common mode of ATP action at P2X receptors. J Biol Chem 283, 20126-20136.

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., 2013. Two open states of P2X receptor channels. Front Cell Neurosci 7, 215.

Rokic, M. B., Stojilkovic, S. S., Vavra, V., Kuzyk, P., Tvrdonova, V., Zemkova, H., 2013. Multiple roles of the extracellular vestibule amino acid residues in the function of the rat P2X4 receptor. PLoS One 8, e59411.

Samways, D. S., Egan, T. M., 2007. Acidic amino acids impart enhanced Ca2+ permeability and flux in two members of the ATP-gated P2X receptor family. J Gen Physiol 129, 245-256.

Samways, D. S., Khakh, B. S., Dutertre, S., Egan, T. M., 2011. Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). Proc Natl Acad Sci U S A 108, 13800-13805.

Samways, D. S., Khakh, B. S., Egan, T. M., 2012. Allosteric modulation of Ca2+ flux in ligand-gated cation channel (P2X4) by actions on lateral portals. J Biol Chem 287, 7594-7602.

Samways, D. S., Li, Z., Egan, T. M., 2014. Principles and properties of ion flow in P2X receptors. Front Cell Neurosci 8, 6.

Samways, D. S., Migita, K., Li, Z., Egan, T. M., 2008. On the role of the first transmembrane domain in cation permeability and flux of the ATP-gated P2X2 receptor. J Biol Chem 283, 5110-5117.

Sensi, S. L., Paoletti, P., Bush, A. I., Sekler, I., 2009. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. Nat Rev Neurosci 10, 780-791.

Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K., Torimitsu, K., 2009. Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X(4) receptors. PLoS Biol 7, e1000103.

Silberberg, S. D., Chang, T. H., Swartz, K. J., 2005. Secondary structure and gating rearrangements of transmembrane segments in rat P2X4 receptor channels. J Gen Physiol 125, 347-359.

Silberberg, S. D., Li, M., Swartz, K. J., 2007. Ivermectin Interaction with transmembrane helices reveals widespread rearrangements during opening of P2X receptor channels. Neuron 54, 263-274.

Stelmashenko, O., Compan, V., Browne, L. E., North, R. A., 2014. Ectodomain movements of an ATP-gated ion channel (P2X2 receptor) probed by disulfide locking. J Biol Chem 289, 9909-9917.

Stelmashenko, O., Lalo, U., Yang, Y., Bragg, L., North, R. A., Compan, V., 2012. Activation of trimeric P2X2 receptors by fewer than three ATP molecules. Mol Pharmacol 82, 760-766.

Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A., North, R. A., 1999. Contribution of individual subunits to the multimeric P2X(2) receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. Mol Pharmacol 56, 973-981.

Tittle, R. K., Hume, R. I., 2008. Opposite effects of zinc on human and rat P2X2 receptors. J Neurosci 28, 11131-11140.

Tittle, R. K., Power, J. M., Hume, R. I., 2007. A histidine scan to probe the flexibility of the rat P2X2 receptor zinc-binding site. J Biol Chem 282, 19526-19533.

Tochitsky, I., Banghart, M. R., Mourot, A., Yao, J. Z., Gaub, B., Kramer, R. H., Trauner, D., 2012. Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nat Chem 4, 105-111.

Valera, S., Hussy, N., Evans, R. J., Adami, N., North, R. A., Surprenant, A., Buell, G., 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. Nature 371, 516-519.

Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F. A., North, R. A., Surprenant, A., 1999. Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. Nat Neurosci 2, 315-321.

Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R. H., Isacoff, E. Y., Trauner, D., 2006. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. Nat Chem Biol 2, 47-52.

Wildman, S. S., Brown, S. G., Rahman, M., Noel, C. A., Churchill, L., Burnstock, G., Unwin, R. J., King, B. F., 2002. Sensitization by extracellular Ca(2+) of rat P2X(5) receptor and its pharmacological properties compared with rat P2X(1). Mol Pharmacol 62, 957-966.

Wildman, S. S., King, B. F., Burnstock, G., 1998. Zn2+ modulation of ATP-responses at recombinant P2X2 receptors and its dependence on extracellular pH. Br J Pharmacol 123, 1214-1220.

Wildman, S. S., King, B. F., Burnstock, G., 1999a. Modulation of ATP-responses at recombinant rP2X4 receptors by extracellular pH and zinc. Br J Pharmacol 126, 762-768.

Wildman, S. S., King, B. F., Burnstock, G., 1999b. Modulatory activity of extracellular H+ and Zn2+ on ATP-responses at rP2X1 and rP2X3 receptors. Br J Pharmacol 128, 486-492.

Wilkinson, W. J., Jiang, L. H., Surprenant, A., North, R. A., 2006. Role of ectodomain lysines in the subunits of the heteromeric P2X2/3 receptor. Mol Pharmacol 70, 1159-1163.

Wirkner, K., Sperlagh, B., Illes, P., 2007. P2X3 receptor involvement in pain states. Mol Neurobiol 36, 165-183.

Yan, Z., Khadra, A., Li, S., Tomic, M., Sherman, A., Stojilkovic, S. S., 2010. Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. J Neurosci 30, 14213-14224.

Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T., Stojilkovic, S. S., 2006. Participation of the Lys313-Ile333 sequence of the purinergic P2X4 receptor in agonist binding and transduction of signals to the channel gate. J Biol Chem 281, 32649-32659.

Zemkova, H., Khadra, A., Rokic, M. B., Tvrdonova, V., Sherman, A., Stojilkovic, S. S., 2015. Allosteric regulation of the P2X4 receptor channel pore dilation. Pflugers Arch 467, 713-726.

Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., Stojilkovic, S. S., 2007. Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X(4) receptor functions. J Neurochem 102, 1139-1150.

Zhao, Q., Yang, M., Ting, A. T., Logothetis, D. E., 2007. PIP(2) regulates the ionic current of P2X receptors and P2X(7) receptor-mediated cell death. Channels (Austin) 1, 46-55.

Zhao, W. S., Wang, J., Ma, X. J., Yang, Y., Liu, Y., Huang, L. D., Fan, Y. Z., Cheng, X. Y., Chen, H. Z., Wang, R., Yu, Y., 2014. Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. Nat Commun 5, 4189.

Zhuo, M., Wu, G., Wu, L. J., 2011. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. Mol Brain 4, 31.

Figure legends

Figure 1. Molecular organization of P2X receptors. (A) Lateral view of the crystal structures of ΔzfP2X4 receptor in a closed state (left, PDB code 4DW0) and in an ATP-bound state (right, PDB code 4DW1) embedded in a lipid bilayer. The three subunits are depicted in cartoon representation and shown in different colours. ATP is in stick representation, the membrane is represented by red, orange and white spheres. ECD and TM stand for extracellular and transmembrane domains, respectively. **(B)** The same structures as in (A), viewed from the extracellular side, along the axis of the central channel. **(C)** Ribbon representation of the folding of one subunit. Each domain is named according to a homology comparison to a dolphin. The extracellular domain is composed of 14 β-sheets and 4 α-helices, whereas 2 α-helices form the transmembrane domain. **(D)** Close up view of the ATP-binding pocket coloured according to domains as in panel (C), the residues (zfP2X4 numbering) indicated are discussed in the text.

Figure 2. Structural rearrangements during gating mechanism. Superimposed structures in the resting state (grey) and the ATP-bound state (coloured) at the site **(A)** and the lower body **(B)**. Black arrows show the relevant motions likely to occur during allosteric transition, leading to the opening of the channel. In panel B the indicated residues are implicated in disulphide locking of the closed state (zfP2X4 numbering).

Figure 3. Mapping of residues implicated in allosteric modulation of P2X activity. Residues contributing to allosteric regulation induced by zinc application on a closed state **(A)** and an ATP-bound state **(B)**. Residues implicated in the production of an inhibitory effect or a potentiation are coloured in red and green, respectively, and positions implicated in both

effects are shown in blue. The amino acid residues H120, H192 and H245 (rP2X2) listed in the text correspond, respectively, to P125, R197 and V251 on the structure of zfP2X4. The amino acid residues H204, H209 and R225 (hP2X2) listed in the text correspond, respectively, to R197, N202 and H219 on the structure of zfP2X4. The amino acid residues C132, D138 and H140 (rP2X4) listed in the text correspond, respectively, to C135, D141 and R143 on the structure of zfP2X4. The amino acid residues H219 and H267 (rP2X7) listed in the text correspond, respectively, to S223 and S271 on the structure of zfP2X4. **(C)** Location of residues associated with IVM potentiation (in red) in the open-state of ΔzfP2X4. The amino acid residues listed on the structure of zfP2X4 Q39, V42, I43, Y45, V46, Y49, V50, Y53, N54, G56, F201, F203, F333, N334, I335, I336, L340, N341, G343, G345, L348, L349, L351, V352, I359 correspond, respectively, to Q36, I39, L40, Y42, V43, W46, V47, W50, E51, G53, F198, F200, W330, D331, I332, I333, I337, N338, G340, G342, L345, L346, V348, A349 and I356 on rP2X4. The residue V28 (rP2X4) is located out of the truncated crystal structure. The amino acid residues listed on the structure of zfP2X4 Y45, V46 and N54 correspond, respectively, to Y42, V43 and E51 on hP2X4. Each subunit is coloured differently.

Figure 4. Optical control of P2X function. (A) Isomerisation of the azobenzene from *trans* to *cis* occurs upon illumination of a particular wavelength λ_1 (usually near UV light) and illumination at a different wavelength λ_2 (in the visible light) or alternatively thermal relaxation (Δt), leads to the isomerisation back to the thermodynamically favoured *trans* isomer. **(B)** Chemical structures of azobenzene compounds used to regulate P2X function by light. The scheme illustrates the light-induced gating mechanism of each photoswitchable probe. **(C)** Whole-cell currents evoked by light (*trans* induced by 525 nm and *cis* induced by 365 nm) in HEK cells expressing I328C rP2X2-3T construct treated by MEA-TMA (taken

from (Lemoine et al., 2013)). **(D)** Lateral view of the transmembrane region of a homology model of rP2X2 based on the ΔzfP2X4 structure bound to ATP (4DW1) showing the location of I328C and P329C mutations that confer light sensitivity to the receptor following labelling with the appropriate photoswitchable probes.

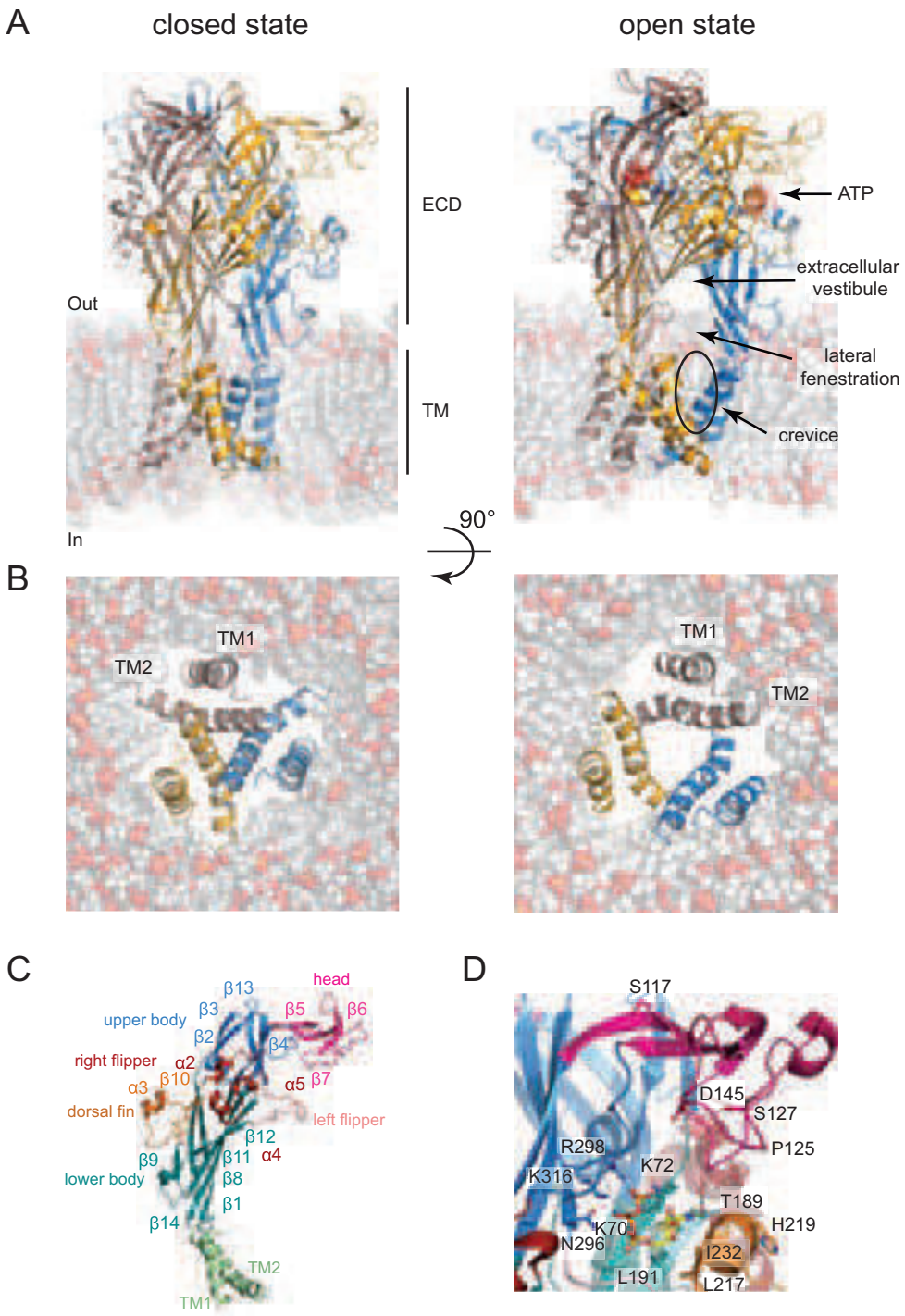
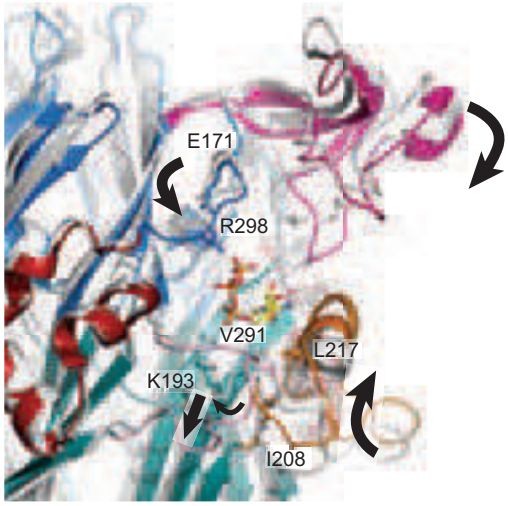

A
closed state
open state
ECD
TM
Out
In
ATP
extracellular vestibule
lateral fenestration
crevice
90°
B
TM1
TM2
TM1
TM2
C
β13
head
β3
β5
β6
upper body
β2
β4
right flipper
α2
α3
β10
α5
β7
dorsal fin
left flipper
β12
β9
β11
α4
lower body
β8
β1
β14
TM2
TM1
D
S117
D145
S127
R298
P125
K316
K72
T189
K70
H219
N296
I232
L191
L217

Figure 1

A


E171
R298
V291
L217
K193
I208

B

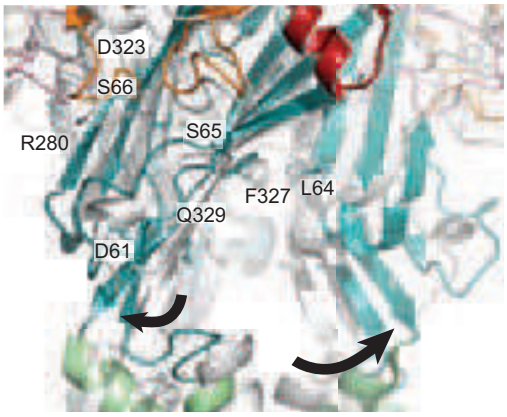

D323
S66
R280
S65
F327
L64
Q329
D61

Figure 2

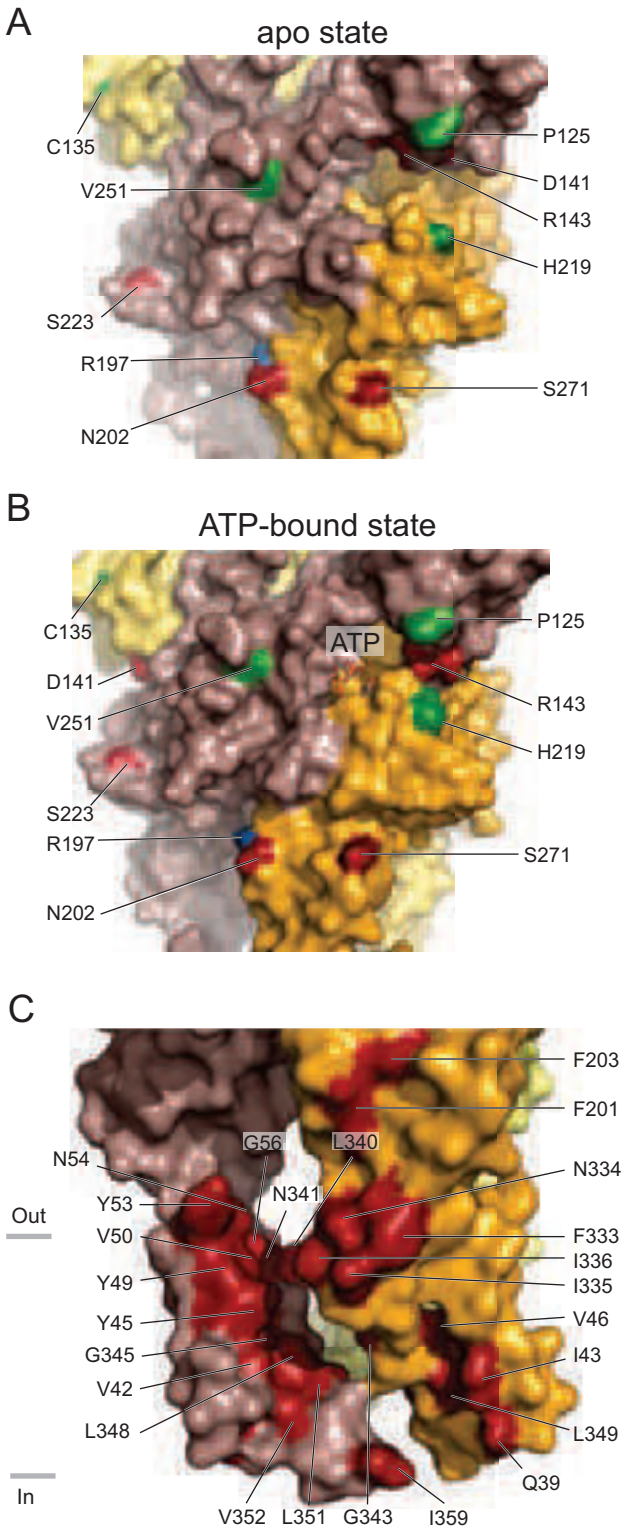

A
apo state
C135
V251
S223
R197
N202
P125
D141
R143
H219
S271
B
ATP-bound state
C135
D141
V251
S223
R197
N202
ATP
P125
R143
H219
S271
C
F203
F201
G56
L340
N54
N334
N341
Y53
Out
V50
F333
I336
Y49
I335
Y45
V46
G345
I43
V42
L348
L349
Q39
In
V352
L351
G343
I359

Figure 3

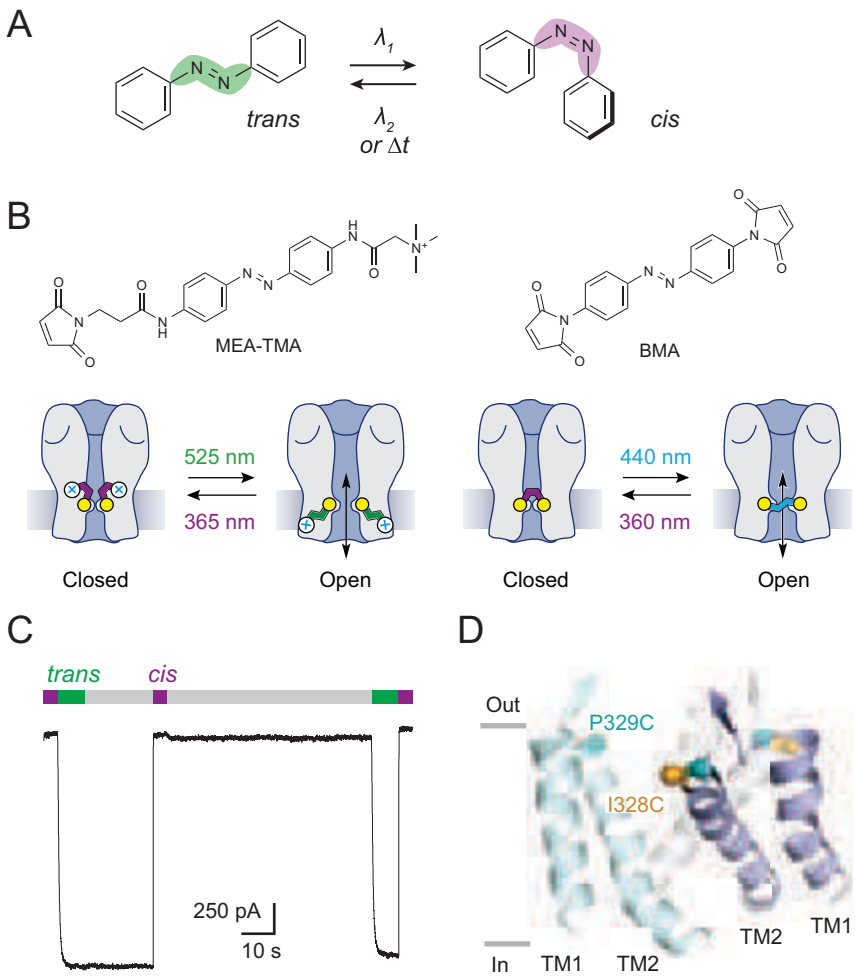
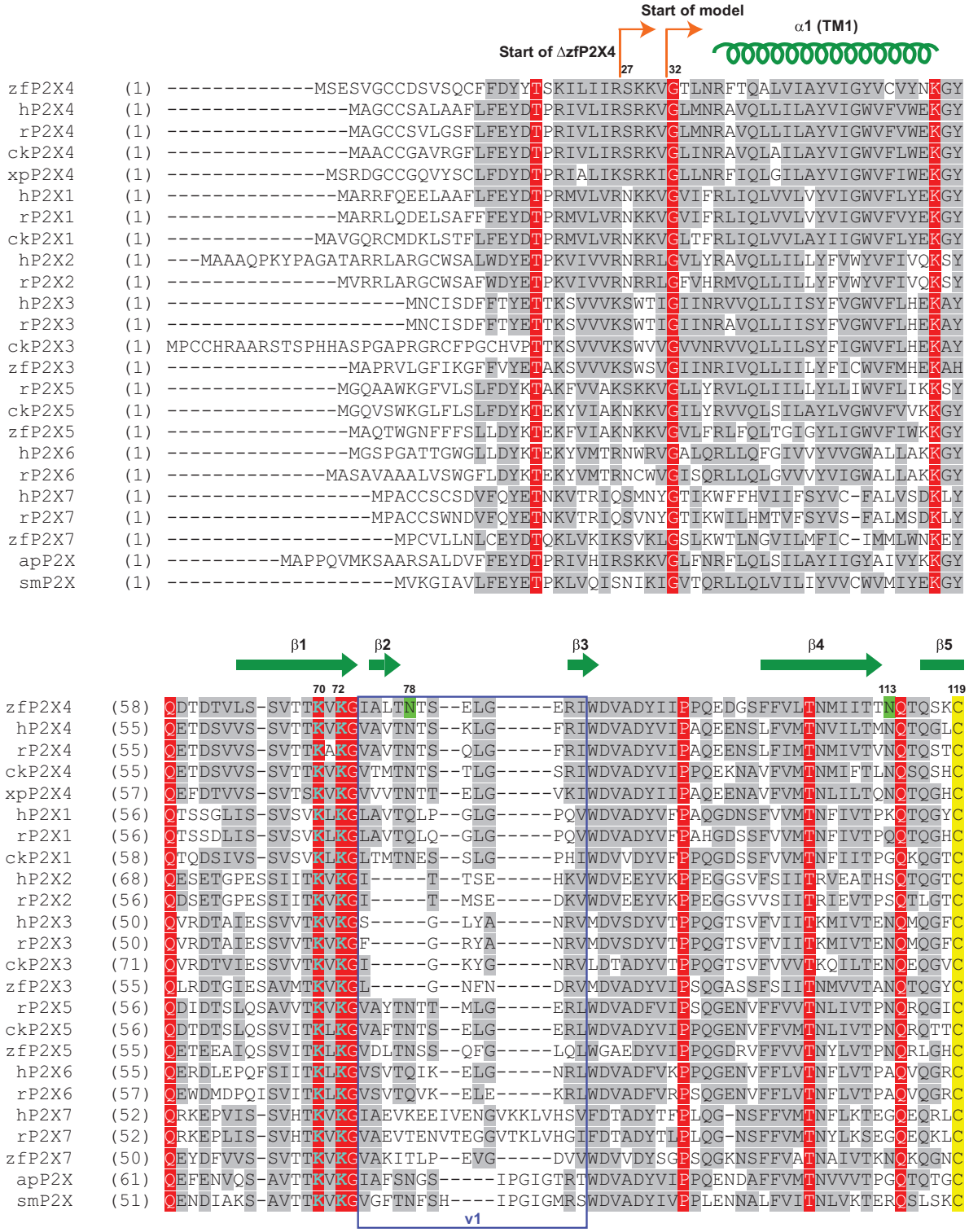

A
trans
λ1
λ2
or Δt
cis
B
MEA-TMA
BMA
525 nm
365 nm
Closed
Open
440 nm
360 nm
Closed
Open
C
trans
cis
250 pA
10 s
D
Out
P329C
I328C
In
TM1
TM2
TM2
TM1

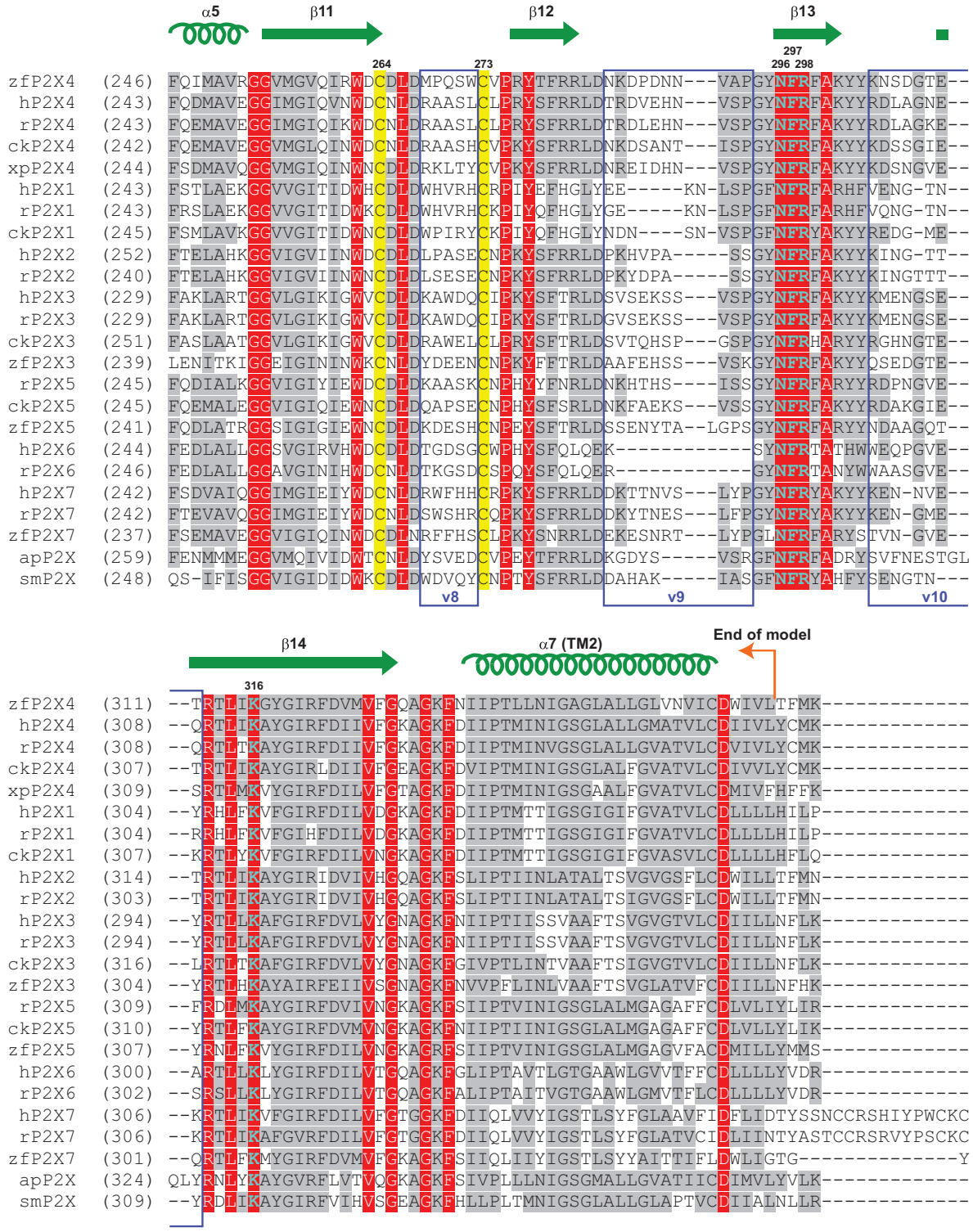
Figure 4

2. Alignement de séquence


Start of model
α1 (TM1)
Start of ΔzfP2X4
27
32
zfP2X4 (1) ----------MSESVGCCDSVSQCFFDYYTSKILIIRSKKVGTLNRFTQALVIAYVIGYVCVYNKGY
hP2X4 (1) ----------MAGCCSALAAFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRAVQLLILAYVIGWVFVWEKGY
rP2X4 (1) ----------MAGCCSVLGSFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLMNRAVQLLILAYVIGWVFVWEKGY
ckP2X4 (1) ----------MAACCGAVRGFLFEYDTPRIVLIRSRKVGLINRAVQLAILAYVIGWVFLWEKGY
xpP2X4 (1) ----------MSRDGCCGQVYSCLFDYDTPRIALIKSRKIGLLNRFIQLGILAYVIGWVFIWEKGY
hP2X1 (1) ----------MARRFQEELAAFLFEYDTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVFLYEKGY
rP2X1 (1) ----------MARRLQDELSAFFFEYDTPRMVLVRNKKVGVIFRLIQLVVLVYVIGWVFVYEKGY
ckP2X1 (1) ----------MAVGQRCMDKLSTFLFEYDTPRMVLVRNKKVGLTFRLIQLVVLAYIIGWVFLYEKGY
hP2X2 (1) ---MAAAQPKYPAGATARRLARGCWSALWDYETPKVIVVRNRRLGVLYRAVQLLILLYFVWYVFIVQKSY
rP2X2 (1) ----------MVRRLARGCWSAFWDYETPKVIVVRNRRLGFVHRMVQLLILLYFVWYVFIVQKSY
hP2X3 (1) ----------MNCISDFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRVVQLLIISYFVGWVFLHEKAY
rP2X3 (1) ----------MNCISDFFTYETTKSVVVKSWTIGIINRAVQLLIISYFVGWVFLHEKAY
ckP2X3 (1) MPCCHRAARSTSPHHASPGAPRGRCFPGCHVPTTKSVVVKSWVVGVVNRVVQLLILSYFIGWVFLHEKAY
zfP2X3 (1) ----------MAPRVLGFIKGFFVYETAKSVVVKSWSVGIINRIVQLLIILYFICWVFMHEKAH
rP2X5 (1) ----------MGQAAWKGFVLSLFDYKTAKFVVAKSKKVGLLYRVLQLIILLYLLIWVFLIKKSY
ckP2X5 (1) ----------MGQVSWKGLFLSLFDYKTEKYVIAKNKKVGILYRVVQLSILAYLVGWVFVVKKGY
zfP2X5 (1) ----------MAQTWGNFFFSLLDYKTEKFVIAKNKKVGVLFRLFQLTGIGYLIGWVFIWKKGY
hP2X6 (1) ----------MGSPGATTGWGLLDYKTEKYVMTRNWRVGALQRLLQFGIVVYVVGWALLAKKGY
rP2X6 (1) ----------MASAVAAALVSWGFLDYKTEKYVMTRNCWVGISQRLLQLGVVVYVIGWALLAKKGY
hP2X7 (1) ----------MPACCSCSDVFQYETNKVTRIQSMNYGTIKWFFHVIIFSYVC-FALVSDKLY
rP2X7 (1) ----------MPACCSWNDVFQYETNKVTRIQSVNYGTIKWILHMTVFSYVS-FALMSDKLY
zfP2X7 (1) ----------MPCVLLNLCEYDTQKLVKIKSVKLGSLKWTLNGVILMFIC-IMMLWNKEY
apP2X (1) ----------MAPPQVMKSAARSALDVFFEYDTPRIVHIRSKKVGLFNRFLQLSILAYIIGYAIVYKKGY
smP2X (1) ----------MVKGIAVLFEYETPKLVQISNIKIGVTQRLLQLVILIYVVCWVMIYEKGY
β1
β2
β3
β4
β5
70 72
78
113
119
zfP2X4 (58) QDTDTVLS-SVTTKVKGIALTNTS--ELG-----ERIWDVADYIIPPQEDGSFFVLTNMIITTNQTQSKC
hP2X4 (55) QETDSVVS-SVTTKVKGVAVTNTS--KLG-----FRIWDVADYVIPAQEENSLFVMTNVILTMNQTQGLC
rP2X4 (55) QETDSVVS-SVTTKAKGVAVTNTS--QLG-----FRIWDVADYVIPAQEENSLFIMTNMIVTVNQTQSTC
ckP2X4 (55) QETDSVVS-SVTTKVKGVTMTNTS--TLG-----SRIWDVADYVIPPQEKNAVFVMTNMIFTLNQSQSHC
xpP2X4 (57) QEFDTVVS-SVTSKVKGVVVTNTT--ELG-----VKIWDVADYIIPAQEENAVFVMTNLILTQNQTQGHC
hP2X1 (56) QTSSGLIS-SVSVKLKGLAVTQLP--GLG-----PQVWDVADYVFPAQGDNSFVVMTNFIVTPKQTQGYC
rP2X1 (56) QTSSDLIS-SVSVKLKGLAVTQLQ--GLG-----PQVWDVADYVFPAHGDSSFVVMTNFIVTPQQTQGHC
ckP2X1 (58) QTQDSIVS-SVSVKLKGLTMTNES--SLG-----PHIWDVVDYVFPPQGDSSFVVMTNFIITPGQKQGTC
hP2X2 (68) QESETGPESSIITKVKGI-----T--TSE-----HKVWDVEEYVKPPEGGSVFSIITRVEATHSQTQGTC
rP2X2 (56) QDSETGPESSIITKVKGI-----T--MSE-----DKVWDVEEYVKPPEGGSVVSIITRIEVTPSQTLGTC
hP2X3 (50) QVRDTAIESSVVTKVKGS-----G--LYA-----NRVMDVSDYVTPPQGTSVFVIITKMIVTENQMQGFC
rP2X3 (50) QVRDTAIESSVVTKVKGF-----G--RYA-----NRVMDVSDYVTPPQGTSVFVIITKMIVTENQMQGFC
ckP2X3 (71) QVRDTVIESSVVTKVKGI-----G--KYG-----NRVLDTADYVTPPQGTSVFVVVTKQILTENQEQGVC
zfP2X3 (55) QLRDTGIESAVMTKVKGL-----G--NFN-----DRVMDVADYVIPSQGASSFSIITNMVVTANQTQGYC
rP2X5 (56) QDIDTSLQSAVVTKVKGVAYTNTT--MLG-----ERLWDVADFVIPSQGENVFFVVTNLIVTPNQRQGIC
ckP2X5 (56) QDTDTSLQSSVITKLKGVAFTNTS--ELG-----ERLWDVADYVIPPQGENVFFVMTNLIVTPNQRQTTC
zfP2X5 (55) QETEEAIQSSVITKLKGVDLTNSS--QFG-----LQLWGAEDYVIPPQGDRVFFVVTNYLVTPNQRLGHC
hP2X6 (55) QERDLEPQFSIITKLKGVSVTQIK--ELG-----NRLWDVADFVKPPQGENVFFLVTNFLVTPAQVQGRC
rP2X6 (57) QEWDMDPQISVITKLKGVSVTQVK--ELE-----KRLWDVADFVRPSQGENVFFLVTNFLVTPAQVQGRC
hP2X7 (52) QRKEPVIS-SVHTKVKGIAEVKEEIVENGVKKLVHSVFDTADYTFPLQG-NSFFVMTNFLKTEGQEQRLC
rP2X7 (52) QRKEPLIS-SVHTKVKGVAEVTENVTEGGVTKLVHGIFDTADYTLPLQG-NSFFVMTNYLKSEGQEQKLC
zfP2X7 (50) QEYDFVVS-SVTTKVKGVAKITLP--EVG-----DVWDVVDYSGPSQGKNSFFVATNAIVTKNQKQGNC
apP2X (61) QEFENVQS-AVTTKVKGIAFSNGS-----IPGIGTRTWDVADYVIPPQENDAFFVMTNVVVTPGQTQTGC
smP2X (51) QENDIAKS-AVTTKVKGVGFTNFSH----IPGIGMRSWDVADYIVPPLENNALFVITNLVKTERQSLSKC
v1

```
                                β5                                                  β6                                  β7
                                                  129       135                                152                                162       168
zfP2X4   (120)  AENP-TPASTCTSHRDCKRGFNDAR--GDGVRTGRCVSYS-------ASVKTCEVLSWCPLEKIVDPPN-
 hP2X4   (117)  PEIP-DATTVCKSDASCTAGSAGTH--SNGVSTGRCVAFN-------GSVKTCEVAAWCPVEDDTHVPQ-
 rP2X4   (117)  PEIP-DKTSICNSDADCTPGLRDTH--SSGVATGRCVPFN-------ESVKTCEVAAWCPVENDVGVPT-
ckP2X4   (117)  PELP-DDNTECN-NSSCVPGYVSTH--SNGIQTGACIPYN-------SSIKTCEVFAWCPVEDDYHIPN-
xpP2X4   (119)  PELP--ETSFCSKEQPCTPGYVGKQ--SNGVQTGKCVPYN-------STVKTCEIFAWCPVENDTHVPD-
 hP2X1   (118)  AEHPE-G-GICKEDSGCTPGKAKRK--AQGIRTGKCVAFND-------TVKTCEIFGWCPVEVDDDIPR-
 rP2X1   (118)  AENPE-G-GICQDDSGCTPGKAERK--AQGIRTGNCVPFNG-------TVKTCEIFGWCPVEVDDKIPS-
ckP2X1   (120)  PELPD-A-GLCRQDSDCSEGTYNRQ--GQGLMTGKCVNYNS-------SMKTCEIFGWCPAEVDYHVPN-
 hP2X2   (126)  PESIRVHNATCLSDADCVAGELDML--GNGLRTGRCVPYYQ------GPSKTCEVFGWCPVEDGASVS--
 rP2X2   (114)  PESMRVHSSTCHSDDDCIAGQLDMQ--GNGIRTGHCVPYYH------GDSKTCEVSAWCPVEDGTSDN--
 hP2X3   (108)  PESE--EKYRCVSDSQCG--PERLP--GGGILTGRCVNYS-------SVLRTCEIQGWCPTEVDTVE---
 rP2X3   (108)  PENE--EKYRCVSDSQCG--PERFP--GGGILTGRCVNYS-------SVLRTCEIQGWCPTEVDTVE---
ckP2X3   (129)  PESE--AAYRCASNRDCQG-KARTT--GSGVLTGRCVPYN-------VSLHTCEIRGWCPPEVDTVD---
zfP2X3   (113)  PEIE--KKFSCTSDGDCEKKIGLNI--GNGMITGKCLNDNGTS----NDTWRCEIQGWCPAEDDTIS---
 rP2X5   (119)  AEREGIPDGECSEDDDCHAGESVVA--GHGLKTGRCLRVGNS------TRGTCEIFAWCPVETKSMPT--
ckP2X5   (119)  PESVNIPDALCHQDEDCPEGQAVVA--GNGVKTGRCLKDRDS------IRGSCEVLAWCPVEKRSKPK--
zfP2X5   (118)  PESPKVPDGFCTNDNECVEGESVLA--GLGVKTGRCLND----------TGTCEINAWCPVEHGHAPV--
 hP2X6   (118)  PEHPSVPLANCWVDEDCPEGEGGTH--SHGVKTGQCVVFNG-------THRTCEIWSWCPVESGVVPS--
 rP2X6   (120)  PEHPSVPLANCWADEDCPEGEMGTY--SHGIKTGQCVAFNG-------THRTCEIWSWCPVESSAVPR--
 hP2X7   (120)  PEYP-TRRTLCSSDRGCKKGWMDPQ--SKGIQTGRCVVYE-------GNQKTCEVSAWCPIEAVEEAPR-
 rP2X7   (120)  PEYP-SRGKQCHSDQGCIKGWMDPQ--SKGIQTGRCIPYD-------QKRKTCEIFAWCPAEEGKEAPR-
zfP2X7   (112)  AEIL-PNGKLCRTDKDCEKGFSDQH--SHGVQTGACVKLE-------ILKKTCEVTAWCPIEN-KKNPR-
 apP2X   (125)  AEDPGVTGAICQTNADCEQVKGTILPSGSGPVTGECVPSDV----PGSKEKVCQIFGWCPLENDKMQG--
 smP2X   (116)  QESSWVPEAACYKDSDCKPYFISHL--GNGAHTGKCIIK------PGNDIGSCEIYSWCPLENDTLPLGR
                     v2                    v3                                v4                                    v5

                α2                β8                β9                α3                                β10       α4
                                  187 188 189                                213                 220                 230
zfP2X4   (179)  -PPLLADAENFTVLIKNNIRYPKFNFNKRNILPNINSSYLTHCVFSRKTD--PDCPIFRLGDIVGEAEED
 hP2X4   (176)  -PAFLKAAENFTLLVKNNIWYPKFNFSKRNILPNITTTYLKSCIYDAKTD--PFCPIFRLGKIVENAGHS
 rP2X4   (176)  -PAFLKAAENFTLLVKNNIWYPKFNFSKRNILPNITTSYLKSCIYNAQTD--PFCPIFRLGTIVEDAGHS
ckP2X4   (175)  -PAFLQGAENFTILVKNNIWYPKFNFSKRNILPTFSSSYLKNCIYDAQTD--PFCPIFRLGKIVEAAGQN
xpP2X4   (177)  -PAFLNGAENFTVLIKNNIWYPKFQVSKRNILSNISSSYLKTCQYDKVNH--PFCPIFRLGNIVKEAGES
 hP2X1   (176)  -PALLREAENFTLFIKNSISFPRFKVNRRNLVEEVNAAHMKTCLFHKTLH--PLCPVFQLGYVVQESGQN
 rP2X1   (176)  -PALLREAENFTLFIKNSISFPRFKVNRRNLVEEVNGTYMKKCLYHKIQH--PLCPVFNLGYVVRESGQD
ckP2X1   (178)  -PALLPEVEKFTIFIKNSITFPKFKVSRRNIVESVTAQYLKECTYHKVTD--SLCPMFELGYVVKESGQN
 hP2X2   (186)  -QFLGTMAPNFTILIKNSIHYPKFHFSKGNIADRTDG-YLKRCTFHEASD--LYCPIFKLGFIVEKAGES
 rP2X2   (174)  -HFLGKMAPNFTILIKNSIHYPKFKFSKGNIASQKSD-YLKHCTFDQDSD--PYCPIFRLGFIVEKAGEN
 hP2X3   (162)  -TPIMMEAENFTIFIKNSIRFPLFNFEKGNLLPNLTARDMKTCRFHPDKD--PFCPILRVGDVVKFAGQD
 rP2X3   (162)  -MPIMMEAENFTIFIKNSIRFPLFNFEKGNLLPNLTDKDIKRCRFHPEKA--PFCPILRVGDVVKFAGQD
ckP2X3   (184)  -VPVMLEAENFTLFIKNSVRFPLFGFEKANLPPQVSAGELQRCRFHPEQQ--PLCPILRLGDVARFAGQD
zfP2X3   (172)  -GKPMHEVENFTIFIKNSIRFPLFGVARGNFPSSLNRSYIQSCNYDPVRH--PFCPIFKVGDILKHLNQS
 rP2X5   (179)  -DPLLKDAESFTISIKNFIRFPKFNFSKANVLETDNKHFLKTCHFSSTN---LYCPIFRLGSIVRWAGAD
ckP2X5   (179)  -KPLLASAENFTVFIKNSIRFPKFKFSKMNVLATTNESYLKTCHYSMEH---PYCPIFLLGNIVRWTGNN
zfP2X5   (174)  -EPMLAKAENFTVYVKNFIKFPKFGFFKSNVLPITNSTYLKTCRYDKDHH--PYCPIFLVGDVINWTGYT
 hP2X6   (177)  -RPLLAQAQNFTLFIKNTVTFSKFNFSKSNALETWDPTYFKHCRYEPQFS--PYCPVFRIGDLVAKAGGT
 rP2X6   (179)  -KPLLAQAKNFTLFIKNTVTFNKFNFSRTNALDTWDNTYFKYCLYDSLSS--PYCPVFRIGDLVAMTGGD
 hP2X7   (179)  -PALLNSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILPGLNIT----CTFHKTQN--PQCPIFRLGDIFRETGDN
 rP2X7   (179)  -PALLRSAENFTVLIKNNIDFPGHNYTTRNILPGMNIS----CTFHKTWN--PQCPIFRLGDIFQEIGEN
zfP2X7   (170)  -PALLAAAENFTVMIKNNIRFPAFNYIRRNILSEMKDTDFKGCIYHRYKN--PYCPIFRLGDIVAEAKEK
 apP2X   (189)  DSPVLENAKNFTVFIKNNIEFPRFGVSRRNILGFYNDTALKTCRWKRGDPKLKFCPIFVLDDIARDAGVT
 smP2X   (178)  KSFLFPMVYNFTLLIKNDINFEKFGIHRRNIQNWASKKFLRTCLYNKTDPENRFCPIFQFGTIFEEANVD
                                                                  v6                v7
```


α5
β11
β12
β13
264
273
297
296 298
zfP2X4 (246) FQIMAVRGGVMGVQIRWDCDLDMPQSWCVPRYTFRRLDNKDPDNN---VAPGYNFRFAKYYKNSDGTE--
hP2X4 (243) FQDMAVEGGIMGIQVNWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDVEHN---VSPGYNFRFAKYYRDLAGNE--
rP2X4 (243) FQEMAVEGGIMGIQIKWDCNLDRAASLCLPRYSFRRLDTRDLEHN---VSPGYNFRFAKYYRDLAGKE--
ckP2X4 (242) FQEMAVEGGVMGLQINWDCNLDRAASHCVPKYSFRRLDNKDSANT---ISPGYNFRFAKYYKDSSGIE--
xpP2X4 (244) FSDMAVQGGVMGIQINWNCDLDRKLTYCVPKYSFRRLDNREIDHN---VSPGYNFRFAKYYKDSNGVE--
hP2X1 (243) FSTLAEKGGVVGITIDWHCDLDWHVRHCRPIYEFHGLYEE-----KN-LSPGFNFRFARHFVENG-TN--
rP2X1 (243) FRSLAEKGGVVGITIDWKCDLDWHVRHCKPIYQFHGLYGE-----KN-LSPGFNFRFARHFVQNG-TN--
ckP2X1 (245) FSMLAVKGGVVGITIDWNCDLDWPIRYCKPIYQFHGLYNDN----SN-VSPGFNFRYAKYYREDG-ME--
hP2X2 (252) FTELAHKGGVIGVIINWDCDLDLPASECNPKYSFRRLDPKHVPA-----SSGYNFRFAKYYKING-TT--
rP2X2 (240) FTELAHKGGVIGVIINWNCDLDLSESECNPKYSFRRLDPKYDPA-----SSGYNFRFAKYYKINGTTT--
hP2X3 (229) FAKLARTGGVLGIKIGWVCDLDKAWDQCIPKYSFTRLDSVSEKSS---VSPGYNFRFAKYYKMENGSE--
rP2X3 (229) FAKLARTGGVLGIKIGWVCDLDKAWDQCIPKYSFTRLDGVSEKSS---VSPGYNFRFAKYYKMENGSE--
ckP2X3 (251) FASLAATGGVLGIKIGWVCDLDRAWELCLPRYSFTRLDSVTQHSP---GSPGYNFRHARYYRGHNGTE--
zfP2X3 (239) LENITKIGGEIGININWKCNLDYDEENCNPKYFFTRLDAAFEHSS---VSKGYNFRFAKYYQSEDGTE--
rP2X5 (245) FQDIALKGGVIGIYIEWDCDLDKAASKCNPHYYFNRLDNKHTHS----ISSGYNFRFARYYRDPNGVE--
ckP2X5 (245) FQEMALEGGVIGIQIEWNCDLDQAPSECNPHYSFSRLDNKFAEKS---VSSGYNFRFAKYYRDAKGIE--
zfP2X5 (241) FQDLATRGGSIGIGIEWNCDLDKDESHCNPEYSFTRLDSSENYTA--LGPSGYNFRFARYYNDAAGQT--
hP2X6 (244) FEDLALLGGSVGIRVHWDCDLDTGDSGCWPHYSFQLQEK----------SYNFRTATHWWEQPGVE--
rP2X6 (246) FEDLALLGGAVGINIHWDCNLDTKGSDCSPQYSFQLQER----------GYNFRTANYWWAASGVE--
hP2X7 (242) FSDVAIQGGIMGIEIYWDCNLDRWFHHCRPKYSFRRLDDKTTNVS---LYPGYNFRYAKYYKEN-NVE--
rP2X7 (242) FTEVAVQGGIMGIEIYWDCNLDSWSHRCQPKYSFRRLDDKYTNES---LFPGYNFRYAKYYKEN-GME--
zfP2X7 (237) FSEMAVEGGVIGIQINWDCDLNRFFHSCLPKYSNRRLDEKESNRT---LYPGLNFRFARYSTVN-GVE--
apP2X (259) FENMMMEGGVMQIVIDWTCNLDYSVEDCVPEYTFRRLDKGDYS-----VSRGFNFRFADRYSVFNESTGL
smP2X (248) QS-IFISGGVIGIDIDWKCDLDWDVQYCNPTYSFRRLDDAHAK-----IASGFNFRYAHFYSENGTN---
v8
v9
v10
β14
α7 (TM2)
End of model
316
zfP2X4 (311) --TRTLIKGYGIRFDVMVFGQAGKFNIIPTLLNIGAGLALLGLVNVICDWIVLTFMK----------
hP2X4 (308) --QRTLIKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPTMINIGSGLALLGMATVLCDIIVLYCMK----------
rP2X4 (308) --QRTLTKAYGIRFDIIVFGKAGKFDIIPTMINVGSGLALLGVATVLCDVIVLYCMK----------
ckP2X4 (307) --TRTLIKAYGIRLDIIVFGEAGKFDVIPTMINIGSGLALFGVATVLCDIVVLYCMK----------
xpP2X4 (309) --SRTLMKVYGIRFDILVFGTAGKFDIIPTMINIGSGAALFGVATVLCDMIVFHFFK----------
hP2X1 (304) --YRHLFKVFGIRFDILVDGKAGKFDIIPTMTTIGSGIGIFGVATVLCDLLLLHILP----------
rP2X1 (304) --RRHLFKVFGIHFDILVDGKAGKFDIIPTMTTIGSGIGIFGVATVLCDLLLLHILP----------
ckP2X1 (307) --KRTLYKVFGIRFDILVNGKAGKFDIIPTMTTIGSGIGIFGVASVLCDLLLLHFLQ----------
hP2X2 (314) --TRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSVGVGSFLCDWILLTFMN----------
rP2X2 (303) --TRTLIKAYGIRIDVIVHGQAGKFSLIPTIINLATALTSIGVGSFLCDWILLTFMN----------
hP2X3 (294) --YRTLLKAFGIRFDVLVYGNAGKFNIIPTIISSVAAFTSVGVGTVLCDIILLNFLK----------
rP2X3 (294) --YRTLLKAFGIRFDVLVYGNAGKFNIIPTIISSVAAFTSVGVGTVLCDIILLNFLK----------
ckP2X3 (316) --LRTLTKAFGIRFDVLVYGNAGKFGIVPTLINTVAAFTSIGVGTVLCDIILLNFLK----------
zfP2X3 (304) --YRTLHKAYAIRFEIIVSGNAGKFNVVPFLINLVAAFTSVGLATVFCDIILLNFHK----------
rP2X5 (309) --FRDLMKAYGIRFDVIVNGKAGKFSIIPTVINIGSGLALMGAGAFFCDLVLIYLIR----------
ckP2X5 (310) --YRTLFKAYGIRFDVMVNGKAGKFNIIPTIINIGSGLALMGAGAFFCDLVLLYLIK----------
zfP2X5 (307) --YRNLFKVYGIRFDILVNGKAGRFSIIPTVINIGSGLALMGAGVFACDMILLYMMS----------
hP2X6 (300) --ARTLLKLYGIRFDILVTGQAGKFGLIPTAVTLGTGAAWLGVVTFFCDLLLLYVDR----------
rP2X6 (302) --SRSLLKLYGIRFDILVTGQAGKFALIPTAITVGTGAAWLGMVTFLCDLLLLYVDR----------
hP2X7 (306) --KRTLIKVFGIRFDILVFGTGGKFDIIQLVVYIGSTLSYFGLAAVFIDFLIDTYSSNCCRSHIYPWCKC
rP2X7 (306) --KRTLIKAFGVRFDILVFGTGGKFDIIQLVVYIGSTLSYFGLATVCIDLIINTYASTCCRSRVYPSCKC
zfP2X7 (301) --QRTLFKMYGIRFDVMVFGKAGKFSIIQLIIYIGSTLSYYAITTIFLDWLIGTG----------Y
apP2X (324) QLYRNLYKAYGVRFLVTVQGKAGKFSIVPLLLNIGSGMALLGVATIICDIMVLYVLK----------
smP2X (309) --YRDLIKAYGIRFVIHVSGEAGKFHLLPLTMNIGSGLALLGLAPTVCDIIALNLLR----------

End of ΔzfP2X4

381

```
zfP2X4  (366) ------RKQHYKEQKYTYVDDFGLLHNEDK----------------------------------------
 hP2X4  (363) ------KRLYYREKKYKYVEDYEQGLASELD----------Q----------------------------
 rP2X4  (363) ------KKYYYRDKKYKYVEDYEQGLSGEMN----------Q----------------------------
ckP2X4  (362) ------KRYFYREKKYKYVEDYELGTSET----------------------------------------
xpP2X4  (364) ------KRHYYREKKYKYVEDYDELVGSECG----------SNP--------------------------
 hP2X1  (359) ------KRHYYKQKKFKYAEDMGPGAA----------------ERDLAATSSTLGLQENMRTS-------
 rP2X1  (359) ------KRHYYKQKKFKYAEDMGPGEG----------------EHDPVATSSTLGLQENMRTS-------
ckP2X1  (362) ------GRDYYKQKKFKYAEQEPSKSN----------------KKEKELDNAP-----------------
 hP2X2  (369) ------KNKVYSHKKFDKVCTPSHPSGSW-----------PVTLARVLGQAPPEPG--HRSEDQHPSPPS
 rP2X2  (358) ------KNKLYSHKKFDKVRTPKHPSSRW-----------PVTLALVLGQIPPPPS--HYSQDQPPSPPS
 hP2X3  (349) ------GADQYKAKKFEEVNETTLKIA-------------ALTNPVYPSDQTTAE---KQSTDSGAFSIG
 rP2X3  (349) ------GADHYKARKFEEVTETTLKGT-------------ASTNPVFASDQATVE---KQSTDSGAYSIG
ckP2X3  (371) ------GAEHYKARKFEEVPEASVSPA-------------PTSPTVCAPGALGDQSREKQSTDSGTFSLG
zfP2X3  (359) ------GADEYKAKKFEEVSGVVPE---------------SGSNILYKGSQVSIKALEKNSNDSGTFSIG
 rP2X5  (364) ------KSEFYRDKKFEKVRGQKEDANVEVEA---------NEMEQERPEDEPLERVRQDEQSQELAQSG
ckP2X5  (365) ------KSNFYRGKKYEEVKSSS----------------------RKSTSPTLNGSQSPDQLGGL----
zfP2X5  (362) ------KSSFYRETKFEAIKKKQSERESREQRERKHARHHRHHHHHHRQDGRHRREEKPTAEMQPLTSIL
 hP2X6  (355) ------EAHFYWRTKYEEAKAPKATANSVWR---------------ELAFASQARLAECLRRSSAPAPTA
 rP2X6  (357) ------EAGFYWRTKYEEARAPKATTNSA----------------------------------------
 hP2X7  (374) CQPCVVNEYYYRKKCESIVEPKPTLKYVSFV----------DESHIRMVNQQLLGRSLQDVKGQEVPRP-
 rP2X7  (374) CEPCAVNEYYYRKKCEPIVEPKPTLKYVSFV----------DEPHIWMVDQQLLGKSLQDVKGQEVPRP-
zfP2X7  (355) YS-KEAKQNYTERKFEAVQDREECFLCVSFV----------DEDNLRVVKKSRK-KILQETKPLSIHQRK
 apP2X  (381) ------AKNFYRDKKYLDVKGQDAFEV-----------------LEEEAGPGEQ---MSEGSTNSVSR--
 smP2X  (364) ------SRDIYQRAKFETIAEEQAHLS-----------------SRRADKAQRKKYGLSKRNTETINENS
```

BIBLIOGRAPHIE

Abad-Zapatero, C., and Metz, J.T. (2005). Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery. Drug Discov. Today *10*, 464–469.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., and Virgilio, F.D. (2012). Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. Cancer Res. *72*, 2957–2969.

Adinolfi, E., Capece, M., Amoroso, F., De Marchi, E., and Franceschini, A. (2015). Emerging roles of P2X receptors in cancer. Curr. Med. Chem. *22*, 878–890.

Aemissegger, A., Kräutler, V., van Gunsteren, W.F., and Hilvert, D. (2005). A Photoinducible β-Hairpin. J. Am. Chem. Soc. *127*, 2929–2936.

Agboh, K.C., Webb, T.E., Evans, R.J., and Ennion, S.J. (2004). Functional Characterization of a P2X Receptor from Schistosoma mansoni. J. Biol. Chem. *279*, 41650–41657.

Agboh, K.C., Powell, A.J., and Evans, R.J. (2009). Characterisation of ATP analogues to cross-link and label P2X receptors. Neuropharmacology *56*, 230–236.

Agteresch, H.J., Burgers, S.A., van der Gaast, A., Wilson, J.H.P., and Dagnelie, P.C. (2003). Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate on tumor growth and survival in advanced lung cancer patients. Anticancer. Drugs *14*, 639–644.

Allsopp, R.C., El Ajouz, S., Schmid, R., and Evans, R.J. (2011). Cysteine Scanning Mutagenesis (Residues Glu52-Gly96) of the Human P2X1 Receptor for ATP: Mapping Agonist Binding And Channel Gating. J. Biol. Chem. *286*, 29207–29217.

Almén, M., Nordström, K.J., Fredriksson, R., and Schiöth, H.B. (2009). Mapping the human membrane proteome: a majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. BMC Biol. *7*, 50.

Armstrong, C.M. (1971). Interaction of Tetraethylammonium Ion Derivatives with the Potassium Channels of Giant Axons. J. Gen. Physiol. *58*, 413–437.

Armstrong, C.M., and Binstock, L. (1965). Anomalous Rectification in the Squid Giant Axon Injected with Tetraethylammonium Chloride. J. Gen. Physiol. *48*, 859–872.

Armstrong, N., and Gouaux, E. (2000). Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core. Neuron *28*, 165–181.

Aschrafi, A., Sadtler, S., Niculescu, C., Rettinger, J., and Schmalzing, G. (2004). Trimeric architecture of homomeric P2X2 and heteromeric P2X1+2 receptor subtypes. J. Mol. Biol. *342*, 333–343.

Baconguis, I., Bohlen, C.J., Goehring, A., Julius, D., and Gouaux, E. (2014). X-Ray Structure of Acid-Sensing Ion Channel 1–Snake Toxin Complex Reveals Open State of a Na+-Selective Channel. Cell *156*, 717–729.

Bandara, H.M.D., and Burdette, S.C. (2012). Photoisomerization in different classes of azobenzene. Chem Soc Rev *41*, 1809–1825.

Banghart, M., Borges, K., Isacoff, E., Trauner, D., and Kramer, R.H. (2004). Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing. Nat. Neurosci. *7*, 1381–1386.

Banghart, M.R., Mourot, A., Fortin, D.L., Yao, J.Z., Kramer, R.H., and Trauner, D. (2009). Photochromic Blockers of Voltage-Gated Potassium Channels. Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 9097–9101.

Bao, L., Locovei, S., and Dahl, G. (2004). Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. FEBS Lett. *572*, 65–68.

Baqi, Y., Hausmann, R., Rosefort, C., Rettinger, J., Schmalzing, G., and Müller, C.E. (2011). Discovery of potent competitive antagonists and positive modulators of the P2X2 receptor. J. Med. Chem. *54*, 817–830.

Barrera, N.P., Ormond, S.J., Henderson, R.M., Murrell-Lagnado, R.D., and Edwardson, J.M. (2005). Atomic Force Microscopy Imaging Demonstrates that P2X2 Receptors Are Trimers but That P2X6 Receptor Subunits Do Not Oligomerize. J. Biol. Chem. *280*, 10759–10765.

Bartels, E., Wassermann, N.H., and Erlanger, B.F. (1971). Photochromic Activators of the Acetylcholine Receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *68*, 1820–1823.

Bavan, S., Farmer, L., Singh, S.K., Straub, V.A., Guerrero, F.D., and Ennion, S.J. (2011). The Penultimate Arginine of the Carboxyl Terminus Determines Slow Desensitization in a P2X Receptor from the Cattle Tick Boophilus microplus. Mol. Pharmacol. *79*, 776–785.

Bean, B.P., Williams, C., and Ceelen, P.W. (1990). ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: current-voltage relation and single-channel behavior. J. Neurosci. *10*, 11–19.

Becker, D., Woltersdorf, R., Boldt, W., Schmitz, S., Braam, U., Schmalzing, G., and Markwardt, F. (2008). The P2X7 Carboxyl Tail Is a Regulatory Module of P2X7 Receptor Channel Activity. J. Biol. Chem. *283*, 25725–25734.

Beharry, A.A., and Woolley, G.A. (2011). Azobenzene photoswitches for biomolecules. Chem. Soc. Rev. *40*, 4422–4437.

Behrends, J.C. (2012). Evolution of the Ion Channel Concept: The Historical Perspective. Chem. Rev. *112*, 6218–6226.

Benedetti, E., and Goodman, M. (1968). Conformational aspects of polypeptide structure. XXVIII. Side-chain Cotton effect from poly-Lp-(2'-hydroxy-5'-methylphenylazo) phenylalanine. Biochemistry (Mosc.) *7*, 4242–4247.

Bernard, C. (1856). Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences / publiés... par MM. les secrétaires perpétuels (Gauthier-Villars (Paris)).

Blaustein, R.O., Cole, P.A., Williams, C., and Miller, C. (2000). Tethered blockers as molecular "tape measures" for a voltage-gated K+ channel. Nat. Struct. Biol. *7*, 309–311.

Bleehen, T., and Keele, C.A. (1977). Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. Pain *3*, 367–377.

Bo, X., Jiang, L.-H., Wilson, H.L., Kim, M., Burnstock, G., Surprenant, A., and North, R.A. (2003). Pharmacological and Biophysical Properties of the Human P2X5 Receptor. Mol. Pharmacol. *63*, 1407–1416.

Bose, M., Groff, D., Xie, J., Brustad, E., and Schultz, P.G. (2006). The Incorporation of a Photoisomerizable Amino Acid into Proteins in E. coli. J. Am. Chem. Soc. *128*, 388–389.

Boué-Grabot, É., Barajas-López, C., Chakfe, Y., Blais, D., Bélanger, D., Émerit, M.B., and Séguéla, P. (2003). Intracellular cross talk and physical interaction between two classes of neurotransmitter-gated channels. J. Neurosci. *23*, 1246–1253.

Boulter, J., Evans, K., Goldman, D., Martin, G., Treco, D., Heinemann, S., and Patrick, J. (1986). Isolation of a cDNA clone coding for a possible neural nicotinic acetylcholine receptor α-subunit. Nature *319*, 368–374.

Boyden, E.S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G., and Deisseroth, K. (2005). Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. Nat. Neurosci. *8*, 1263–1268.

Brake, A.J., Wagenbach, M.J., and Julius, D. (1994). New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. Nature *371*, 519–523.

Browne, L.E., and North, R.A. (2013). P2X Receptor Intermediate Activation States Have Altered Nucleotide Selectivity. J. Neurosci. *33*, 14801–14808.

Browne, L.E., Cao, L., Broomhead, H.E., Bragg, L., Wilkinson, W.J., and North, R.A. (2011). P2X receptor channels show threefold symmetry in ionic charge selectivity and unitary conductance. Nat. Neurosci. *14*, 17–18.

Browne, L.E., Compan, V., Bragg, L., and North, R.A. (2013). P2X7 Receptor Channels Allow Direct Permeation of Nanometer-Sized Dyes. J. Neurosci. *33*, 3557–3566.

Browne, L.E., Nunes, J.P.M., Sim, J.A., Chudasama, V., Bragg, L., Caddick, S., and Alan North, R. (2014). Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. Proc. Natl. Acad. Sci. *111*, 521–526.

Burnstock, G. (2014). Purinergic signalling: from discovery to current developments: Purinergic signalling: from discovery to current developments. Exp. Physiol. *99*, 16–34.

Burnstock, G. and Verkhratsky, A. (2009). Evolutionary origins of the purinergic signalling system. Acta Physiol. *195*, 415-447.

Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., and Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. Br. J. Pharmacol. *40*, 668–688.

Caamano, A.M., Vazquez, M.E., Martínez-Costas, J., Castedo, L., and Mascarenas, J.L. (1997). A Light-Modulated Sequence-Specific DNA-Binding Peptide*. Angew Chem Int Ed Engl *36*, 2036–2056.

Cao, L., Young, M.T., Broomhead, H.E., Fountain, S.J., and North, R.A. (2007). Thr339-to-Serine Substitution in Rat P2X2 Receptor Second Transmembrane Domain Causes Constitutive Opening and Indicates a Gating Role for Lys308. J. Neurosci. *27*, 12916–12923.

Cao, L., Broomhead, H.E., Young, M.T., and North, R.A. (2009). Polar Residues in the Second Transmembrane Domain of the Rat P2X2 Receptor That Affect Spontaneous Gating, Unitary Conductance, and Rectification. J. Neurosci. *29*, 14257–14264.

Carter, D.S., Alam, M., Cai, H., Dillon, M.P., Ford, A.P.D.W., Gever, J.R., Jahangir, A., Lin, C., Moore, A.G., Wagner, P.J., et al. (2009). Identification and SAR of novel diaminopyrimidines. Part 1: The discovery of RO-4, a dual P2X3/P2X2/3 antagonist for the treatment of pain. Bioorg. Med. Chem. Lett. *19*, 1628–1631.

Cavaliere, F., Florenzano, F., Amadio, S., Fusco, F.R., Viscomi, M.T., D'Ambrosi, N., Vacca, F., Sancesario, G., Bernardi, G., Molinari, M., et al. (2003). Up-regulation of p2x2, p2x4 receptor and ischemic cell death: prevention by p2 antagonists. Neuroscience *120*, 85–98.

Chabala, L.D., and Lester, H.A. (1986). Activation of acetylcholine receptor channels by covalently bound agonists in cultured rat myoballs. J. Physiol. *379*, 83–108.

Changeux, J.-P., Kasai, M., and Lee, C.-Y. (1970). Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. *67*, 1241–1247.

Chataigneau, T., Lemoine, D., and Grutter, T. (2013). Exploring the ATP-binding site of P2X receptors. Front. Cell. Neurosci. *7*.

Chaumont, S., and Khakh, B.S. (2008). Patch-clamp coordinated spectroscopy shows P2X2 receptor permeability dynamics require cytosolic domain rearrangements but not Panx-1 channels. Proc. Natl. Acad. Sci. *105*, 12063–12068.

Chen, Y., Yao, Y., Sumi, Y., Li, A., To, U.K., Elkhal, A., Inoue, Y., Woehrle, T., Zhang, Q., Hauser, C., et al. (2010). Purinergic Signaling: A Fundamental Mechanism in Neutrophil Activation. Sci. Signal. *3*, ra45–ra45.

Chessell, I.P., Hatcher, J.P., Bountra, C., Michel, A.D., Hughes, J.P., Green, P., Egerton, J., Murfin, M., Richardson, J., Peck, W.L., et al. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. Pain *114*, 386–396.

Chi, L., Sadovski, O., and Woolley, G.A. (2006). A blue-green absorbing cross-linker for rapid photoswitching of peptide helix content. Bioconjug. Chem. *17*, 670–676.

Chong, J.-H., Zheng, G.-G., Zhu, X.-F., Guo, Y., Wang, L., Ma, C.-H., Liu, S.-Y., Xu, L.-L., Lin, Y.-M., and Wu, K.-F. (2010a). Abnormal expression of P2X family receptors in Chinese pediatric acute leukemias. Biochem. Biophys. Res. Commun. *391*, 498–504.

Chong, J.-H., Zheng, G.-G., Ma, Y.-Y., Zhang, H.-Y., Nie, K., Lin, Y.-M., and Wu, K.-F. (2010b). The Hyposensitive N187D P2X7 Mutant Promotes Malignant Progression in Nude Mice. J. Biol. Chem. *285*, 36179–36187.

Clyne, J.D., Wang, L.-F., and Hume, R.I. (2002). Mutational analysis of the conserved cysteines of the rat P2X2 purinoceptor. J. Neurosci. *22*, 3873–3880.

Coddou, C., Lorca, R.A., Acuña-Castillo, C., Grauso, M., Rassendren, F., and Huidobro-Toro, J.P. (2005). Heavy metals modulate the activity of the purinergic P2X4 receptor. Toxicol. Appl. Pharmacol. *202*, 121–131.

Coddou, C., Codocedo, J.F., Li, S., Lillo, J.G., Acuña-Castillo, C., Bull, P., Stojilkovic, S.S., and Huidobro-Toro, J.P. (2009). Reactive oxygen species potentiate the P2X2 receptor activity through intracellular Cys430. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. *29*, 12284–12291.

Coddou, C., Yan, Z., Obsil, T., Huidobro-Toro, J.P., and Stojilkovic, S.S. (2011a). Activation and Regulation of Purinergic P2X Receptor Channels. Pharmacol. Rev. *63*, 641–683.

Coddou, C., Stojilkovic, S.S., and Huidobro-Toro, J.P. (2011b). Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. Rev. Neurosci. *22*, 335–354.

Collier, James, and Schneider (1966). Antagonism by aspirin and fenamates of bronchoconstriction and nociception induced by adenosine-5 0 -triphosphate. Nature *212*, 411–412.

Collo, G., North, R.A., Kawashima, E., Merlo-Pich, E., Neidhart, S., Surprenant, A., and Buell, G. (1996). Cloning of P2X5 and P2X6 receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. J. Neurosci. *16*, 2495–2507.

Corringer, P.-J., Novère, N.L., and Changeux, J.-P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *40*, 431–458.

Dale, N., and Frenguelli, B.G. (2012). Measurement of purine release with microelectrode biosensors. Purinergic Signal. *8*, 27–40.

Davenport, R. (2002). Glutamate Receptors in Plants. Ann. Bot. *90*, 549–557.

Digby, H.R., Roberts, J.A., Sutcliffe, M.J., and Evans, R.J. (2005). Contribution of conserved glycine residues to ATP action at human P2X1 receptors: mutagenesis indicates that the glycine at position 250 is important for channel function. J. Neurochem. *95*, 1746–1754.

Ding, S., and Sachs, F. (1999). Single channel properties of P2X2 purinoceptors. J. Gen. Physiol. *113*, 695–720.

Dokić, J., Gothe, M., Wirth, J., Peters, M.V., Schwarz, J., Hecht, S., and Saalfrank, P. (2009). Quantum Chemical Investigation of Thermal Cis-to-Trans Isomerization of Azobenzene Derivatives: Substituent Effects, Solvent Effects, and Comparison to Experimental Data. J. Phys. Chem. A *113*, 6763–6773.

Donato, L., Mourot, A., Davenport, C.M., Herbivo, C., Warther, D., Léonard, J., Bolze, F., Nicoud, J.-F., Kramer, R.H., Goeldner, M., 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 λ=800 nm. Angew. Chem. Int. Ed. *51*, 1840–1843.

Doyle, D.A., Cabral, J.M., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity. Science *280*, 69–77.

Drury, A.N., and Szent-Györgyi, A. v (1929). The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart1. J. Physiol. *68*, 213–237.

Du, J., Dong, H., and Zhou, H.-X. (2012). Gating mechanism of a P2X4 receptor developed from normal mode analysis and molecular dynamics simulations. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 4140–4145.

Egan, T.M. (2004). Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. J. Neurosci. *24*, 3413–3420.

Egan, T.M., and Khakh, B.S. (2004). Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses. J. Neurosci. *24*, 3413–3420.

Egan, T.M., Haines, W.R., and Voigt, M.M. (1998). A domain contributing to the ion channel of ATP-gated P2X2 receptors identified by the substituted cysteine accessibility method. J. Neurosci. *18*, 2350–2359.

Eickhorst, A.N., Berson, A., Cockayne, D., Lester, H.A., and Khakh, B.S. (2002). Control of P2X2 Channel Permeability by the Cytosolic Domain. J. Gen. Physiol. *120*, 119–131.

Ennion, S., Hagan, S., and Evans, R.J. (2000). The Role of Positively Charged Amino Acids in ATP Recognition by Human P2X1 Receptors. J. Biol. Chem. *275*, 29361–29367.

Erhlich, P. (1913). Chemotherapeutics: Scientific principles, methods and results. The Lancet *2*, 445–451.

Estrela, J.M., Obrador, E., Navarro, J., Lasso De la Vega, M.C., and Pellicer, J.A. (1995). Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. Nat. Med. *1*, 84–88.

Fischer, W., Zadori, Z., Kullnick, Y., Gröger-Arndt, H., Franke, H., Wirkner, K., Illes, P., and Mager, P.P. (2007). Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X3 receptors are involved in agonist binding. Eur. J. Pharmacol. *576*, 7–17.

Fisher, J.A., Girdler, G., and Khakh, B.S. (2004). Time-Resolved Measurement of State-Specific P2X2 Ion Channel Cytosolic Gating Motions. J. Neurosci. *24*, 10475–10487.

Flint, D.G., Kumita, J.R., Smart, O.S., and Woolley, G.A. (2002). Using an azobenzene cross-linker to either increase or decrease peptide helix content upon trans-to-cis photoisomerization. Chem. Biol. *9*, 391–397.

Fortin, D.L., Banghart, M.R., Dunn, T.W., Borges, K., Wagenaar, D.A., Gaudry, Q., Karakossian, M.H., Otis, T.S., Kristan, W.B., Trauner, D., et al. (2008). Photochemical control of endogenous ion channels and cellular excitability. Nat. Methods *5*, 331–338.

Fortin, D.L., Dunn, T.W., Fedorchak, A., Allen, D., Montpetit, R., Banghart, M.R., Trauner, D., Adelman, J.P., and Kramer, R.H. (2011). Optogenetic photochemical control of designer K+ channels in mammalian neurons. J. Neurophysiol. *106*, 488–496.

Foucaud, B., Perret, P., Grutter, T., and Goeldner, M. (2001). Cysteine mutants as chemical sensors for ligand–receptor interactions. Trends Pharmacol. Sci. *22*, 170–173.

Foucaud, B., Laube, B., Schemm, R., Kreimeyer, A., Goeldner, M., and Betz, H. (2003). Structural Model of the N-Methyl-D-aspartate Receptor Glycine Site Probed by Site-directed Chemical Coupling. J. Biol. Chem. *278*, 24011–24017.

Fountain, S.J., and North, R.A. (2006). A C-terminal Lysine That Controls Human P2X4 Receptor Desensitization. J. Biol. Chem. *281*, 15044–15049.

Fountain, S.J., Parkinson, K., Young, M.T., Cao, L., Thompson, C.R.L., and North, R.A. (2007). An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in Dictyostelium discoideum. Nature *448*, 200–203.

Fountain, S.J., Cao, L., Young, M.T., and North, R.A. (2008). Permeation Properties of a P2X Receptor in the Green Algae Ostreococcus tauri. J. Biol. Chem. *283*, 15122–15126.

Fredholm, Abbracchio, Burnstock, Daly, Harden, Jacobson, Leff, and Williams (1994). Nomenclature and Classification of Purinoceptors. Pharmacol. Rev. *46*, 43–56.

Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2006). Regulation of the desensitization and ion selectivity of ATP-gated P2X2 channels by phosphoinositides: P2X modulation by phospholipids. J. Physiol. *576*, 135–149.

Galzi, J.-L., Revah, F., Bouet, F., Menez, A., Goeldner, M., Hirth, C., and Changeux, J.-P. (1991). Allosteric transitions of the acetylcholine receptor probed at the amino acid level with a photolabile cholinergic ligand. Proc. Natl. Acad. Sci. *88*, 5051–5055.

Gao, C., Yu, Q., Xu, H., Zhang, L., Liu, J., Jie, Y., Ma, W., Samways, D.S.K., and Li, Z. (2015). Roles of the lateral fenestration residues of the P2X4 receptor that contribute to the channel function and the deactivation effect of ivermectin. Purinergic Signal. *11*, 229–238.

Gautier, A., Gauron, C., Volovitch, M., Bensimon, D., Jullien, L., and Vriz, S. (2014). How to control proteins with light in living systems. Nat. Chem. Biol. *10*, 533–541.

Gibson, F. (1982). The Leeuwenhoek Lecture, 1981: The Biochemical and Genetic Approach to the Study of Bioenergetics with the Use of Escherichia coli: Progress and Prospects. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. *215*, 1–18.

Gonzales, E.B., Kawate, T., and Gouaux, E. (2009). Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. Nature *460*, 599–604.

Gordon, G.R.J., Baimoukhametova, D.V., Hewitt, S.A., Rajapaksha, W.R.A.K.J.S., Fisher, T.E., and Bains, J.S. (2005). Norepinephrine triggers release of glial ATP to increase postsynaptic efficacy. Nat. Neurosci. *8*, 1078–1086.

Green, H.N., and Stoner, H.B. (1950). Biological Actions of the Adenine Nucleotides (London: H.K. Lewis and Co).

Grutter, T., Bertrand, S., Kotzyba-Hibert, F., Bertrand, D., and Goeldner, M. (2002). Structural Reorganization of the Acetylcholine Binding Site of the Torpedo Nicotinic Receptor as Revealed by Dynamic Photoaffinity Labeling. ChemBioChem *3*, 652–658.

Guerrero, L., Smart, O.S., Woolley, G.A., and Allemann, R.K. (2005a). Photocontrol of DNA binding specificity of a miniature engrailed homeodomain. J. Am. Chem. Soc. *127*, 15624–15629.

Guerrero, L., Smart, O.S., Weston, C.J., Burns, D.C., Woolley, G.A., and Allemann, R.K. (2005b). Photochemical regulation of DNA-binding specificity of MyoD. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *44*, 7778–7782.

Gunosewoyo, H., and Kassiou, M. (2010). P2X purinergic receptor ligands: recently patented compounds. Expert Opin. Ther. Pat. *20*, 625–646.

Haines, W.R., Migita, K., Cox, J.A., Egan, T.M., and Voigt, M.M. (2001). The First Transmembrane Domain of the P2X Receptor Subunit Participates in the Agonist-induced Gating of the Channel. J. Biol. Chem. *276*, 32793–32798.

Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflüg. Arch. *391*, 85–100.

Hansen, S.B., Sulzenbacher, G., Huxford, T., Marchot, P., Taylor, P., and Bourne, Y. (2005). Structures of Aplysia AChBP complexes with nicotinic agonists and antagonists reveal distinctive binding interfaces and conformations. EMBO J. *24*, 3635–3646.

Hartley, G.S. (1937). The Cis-form of Azobenzene. Nature *140*, 281.

Haskell, C.M., Mendoza, E., Pisters, K.M., Fossella, F.V., and Figlin, R.A. (1998). Phase II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non-small cell lung cancer. Invest. New Drugs *16*, 81–85.

Hattori, M., and Gouaux, E. (2012). Molecular mechanism of ATP binding and ion channel activation in P2X receptors. Nature *485*, 207–212.

Hausmann, R., Bahrenberg, G., Kuhlmann, D., Schumacher, M., Braam, U., Bieler, D., Schlusche, I., and Schmalzing, G. (2014). A hydrophobic residue in position 15 of the rP2X3 receptor slows desensitization and reveals properties beneficial for pharmacological analysis and high-throughput screening. Neuropharmacology *79*, 603–615.

Hausmann, R., Kless, A., and Schmalzing, G. (2015). Key sites for P2X receptor function and multimerization: overview of mutagenesis studies on a structural basis. Curr. Med. Chem. *22*, 799–818.

Hechler, B., Lenain, N., Marchese, P., Vial, C., Heim, V., Freund, M., Cazenave, J.-P., Cattaneo, M., Ruggeri, Z.M., Evans, R., et al. (2003). A Role of the Fast ATP-gated P2X1 Cation Channel in Thrombosis of Small Arteries In Vivo. J. Exp. Med. *198*, 661–667.

Hechler, B., Magnenat, S., Zighetti, M.L., Kassack, M.U., Ullmann, H., Cazenave, J.-P., Evans, R., Cattaneo, M., and Gachet, C. (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]. J. Pharmacol. Exp. Ther. *314*, 232–243.

Hegemann, P., and Möglich, A. (2011). Channelrhodopsin engineering and exploration of new optogenetic tools. Nat. Methods *8*, 39–42.

Hemmings-Mieszczak, M., Dorn, G., Natt, F.J., Hall, J., and Wishart, W.L. (2003). Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X3 receptor. Nucleic Acids Res. *31*, 2117–2126.

Heymann, G., Dai, J., Li, M., Silberberg, S.D., Zhou, H.-X., and Swartz, K.J. (2013). Inter- and intrasubunit interactions between transmembrane helices in the open state of P2X receptor channels. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, E4045–E4054.

Hill, L.M., Gavala, M.L., Lenertz, L.Y., and Bertics, P.J. (2010). Extracellular ATP may contribute to tissue repair by rapidly stimulating purinergic receptor X7-dependent vascular endothelial growth factor release from primary human monocytes. J. Immunol. *185*, 3028–3034.

Hille, B. (1968). Pharmacological Modifications of the Sodium Channels of Frog Nerve. J. Gen. Physiol. *51*, 199–219.

Hisadome, K., Koyama, T., Kimura, C., Droogmans, G., Ito, Y., and Oike, M. (2002). Volume-regulated anion channels serve as an auto/paracrine nucleotide release pathway in aortic endothelial cells. J. Gen. Physiol. *119*, 511–520.

Höber, R. (1905). über den Einfluss der Salze auf den Ruhestrom des Froschmuskels. Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol. *106*, 599–635.

Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1945). Resting and action potentials in single nerve fibres. J. Physiol. *104*, 176–195.

Hodgkin, A.L., Huxley, A.F., and Katz, B. (1952). Measurement of current-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol. *116*, 424–448.

Holton, P. (1959). The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. J. Physiol. *145*, 494–504.

Huang, L.-D., Fan, Y.-Z., Tian, Y., Yang, Y., Liu, Y., Wang, J., Zhao, W.-S., Zhou, W.-C., Cheng, X.-Y., Cao, P., et al. (2014). Inherent Dynamics of Head Domain Correlates with ATP-Recognition of P2X4 Receptors: Insights Gained from Molecular Simulations. PLoS ONE *9*, e97528.

Ide, S., Nishizawa, D., Fukuda, K., Kasai, S., Hasegawa, J., Hayashida, M., Minami, M., and Ikeda, K. (2014). Haplotypes of P2RX7 gene polymorphisms are associated with both cold pain sensitivity and analgesic effect of fentanyl. Mol. Pain *10*, 75.

Jacobson, K.A., Jarvis, M.F., and Williams, M. (2002). Purine and Pyrimidine (P2) Receptors as Drug Targets. J. Med. Chem. *45*, 4057–4093.

James, D.A., Burns, D.C., and Woolley, G.A. (2001). Kinetic characterization of ribonuclease S mutants containing photoisomerizable phenylazophenylalanine residues. Protein Eng. Des. Sel. *14*, 983–991.

Jarvis, M.F., and Khakh, B.S. (2009). ATP-gated P2X cation-channels. Neuropharmacology *56*, 208–215.

Jarvis, M.F., Burgard, E.C., McGaraughty, S., Honore, P., Lynch, K., Brennan, T.J., Subieta, A., van Biesen, T., Cartmell, J., Bianchi, B., 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. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 17179–17184.

Jelassi, B., Anchelin, M., Chamouton, J., Cayuela, M.L., Clarysse, L., Li, J., Goré, J., Jiang, L.-H., and Roger, S. (2013). Anthraquinone emodin inhibits human cancer cell invasiveness by antagonizing P2X7 receptors. Carcinogenesis *34*, 1487–1496.

Jelínková, I., Yan, Z., Liang, Z., Moonat, S., Teisinger, J., Stojilkovic, S.S., and Zemková, H. (2006). Identification of P2X4 receptor-specific residues contributing to the ivermectin effects on channel deactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun. *349*, 619–625.

Jelínkova, I., Vávra, V., Jindrichova, M., Obsil, T., Zemkova, H.W., Zemkova, H., and Stojilkovic, S.S. (2008). Identification of P2X4 receptor transmembrane residues contributing to channel gating and interaction with ivermectin. Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol. *456*, 939–950.

Jiang, L.-H., Rassendren, F., Surprenant, A., and North, R.A. (2000). Identification of Amino Acid Residues Contributing to the ATP-binding Site of a Purinergic P2X Receptor. J. Biol. Chem. *275*, 34190–34196.

Jiang, L.-H., Rassendren, F., Spelta, V., Surprenant, A., and North, R.A. (2001). Amino Acid Residues Involved in Gating Identified in the First Membrane-spanning Domain of the Rat P2X2 Receptor. J. Biol. Chem. *276*, 14902–14908.

Jiang, L.-H., Kim, M., Spelta, V., Bo, X., Surprenant, A., and North, R.A. (2003). Subunit arrangement in P2X receptors. J. Neurosci. *23*, 8903–8910.

Jiang, R., Martz, A., Gonin, S., Taly, A., de Carvalho, L.P., and Grutter, T. (2010). A Putative Extracellular Salt Bridge at the Subunit Interface Contributes to the Ion Channel Function of the ATP-gated P2X2 Receptor. J. Biol. Chem. *285*, 15805–15815.

Jiang, R., Lemoine, D., Martz, A., Taly, A., Gonin, S., Prado de Carvalho, L., Specht, A., and Grutter, T. (2011). Agonist trapped in ATP-binding sites of the P2X2 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 9066–9071.

Jiang, R., Taly, A., Lemoine, D., Martz, A., Cunrath, O., and Grutter, T. (2012). Tightening of the ATP-binding sites induces the opening of P2X receptor channels. EMBO J. *31*, 2134–2143.

Jones, A.K., Davis, P., Hodgkin, J., and Sattelle, D.B. (2007). The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the nematode Caenorhabditis elegans: an update on nomenclature. Invert. Neurosci. *7*, 129–131.

Kaczmarek-Hájek, K., Lörinczi, É., Hausmann, R., and Nicke, A. (2012). Molecular and functional properties of P2X receptors—recent progress and persisting challenges. Purinergic Signal. *8*, 375–417.

Kao, P.N., Dwork, A.J., Kaldany, R.R., Silver, M.L., Wideman, J., Stein, S., and Karlin, A. (1984). Identification of the alpha subunit half-cystine specifically labeled by an affinity reagent for the acetylcholine receptor binding site. J. Biol. Chem. *259*, 11662–11665.

Kardos, J., Kovács, I., Hajós, F., Kálmán, M., and Simonyi, M. (1989). Nerve endings from rat brain tissue release copper upon depolarization. A possible role in regulating neuronal excitability. Neurosci. Lett. *103*, 139–144.

Karlin, A., and Akabas, M.H. (1998). [8] Substituted-cysteine accessibility method. Methods Enzymol. *293*, 123–145.

Kassack, M.U., Braun, K., Ganso, M., Ullmann, H., Nickel, P., Böing, B., Müller, G., and Lambrecht, G. (2004). Structure–activity relationships of analogues of NF449 confirm NF449 as the most potent and selective known P2X1 receptor antagonist. Eur. J. Med. Chem. *39*, 345–357.

Katz, B., and Miledi, R. (1970). Membrane noise produced by Acetylcholine. Nature *226*, 962–963.

Kaufman, H., Vratsanos, S.M., and Erlanger, B.F. (1968). Photoregulation of an enzymic process by means of a light-sensitive ligand. Science *162*, 1487–1489.

Kawate, T., and Gouaux, E. (2006). Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins. Struct. Lond. Engl. 1993 *14*, 673–681.

Kawate, T., Michel, J.C., Birdsong, W.T., and Gouaux, E. (2009). Crystal structure of the ATP-gated P2X4 ion channel in the closed state. Nature *460*, 592–598.

Kawate, T., Robertson, J.L., Li, M., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2011). Ion access pathway to the transmembrane pore in P2X receptor channels. J. Gen. Physiol. *137*, 579–590.

Keystone, E.C., Wang, M.M., Layton, M., Hollis, S., McInnes, I.B., and D1520C00001 Study Team (2012). Clinical evaluation of the efficacy of the P2X7 purinergic receptor antagonist AZD9056 on the signs and symptoms of rheumatoid arthritis in patients with active disease despite treatment with methotrexate or sulphasalazine. Ann. Rheum. Dis. *71*, 1630–1635.

Khakh, B.S., and Egan, T.M. (2004). Contribution of transmembrane regions to ATP-gated P2X2 channel permeability dynamics. J. Biol. Chem. *280*, 6118–6129.

Khakh, B.S., and North, R.A. (2006). P2X2 receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. Nature. *442*, 527–532.

Khakh, B.S., Proctor, W.R., Dunwiddie, T.V., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999a). Allosteric Control of Gating and Kinetics at P2X4Receptor Channels. J. Neurosci. *19*, 7289–7299.

Khakh, B.S., Bao, X.R., Labarca, C., and Lester, H.A. (1999b). Neuronal P2X transmitter-gated cation channels change their ion selectivity in seconds. Nat. Neurosci. *2*, 322–330.

Kim, Y.-C., Brown, S.G., Harden, T.K., Boyer, J.L., Dubyak, G., King, B.F., Burnstock, G., and Jacobson, K.A. (2001). Structure−Activity Relationships of Pyridoxal Phosphate Derivatives as Potent and Selective Antagonists of $P2X_1$ Receptors. J. Med. Chem. *44*, 340–349.

Klapperstück, M., Büttner, C., Nickel, P., Schmalzing, G., Lambrecht, G., and Markwardt, F. (2000). Antagonism by the suramin analogue NF279 on human P2X1 and P2X7 receptors. Eur. J. Pharmacol. *387*, 245–252.

Koshland, D.E., Némethy, G., and Filmer, D. (1966). Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits. Biochemistry (Mosc.) *5*, 365–385.

Kotzyba-Hibert, F., Kapfer, I., and Goeldner, M. (1995). Recent Trends in Photoaffinity Labeling. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. *34*, 1296–1312.

Kracun, S., Chaptal, V., Abramson, J., and Khakh, B.S. (2010). Gated Access to the Pore of a P2X Receptor: Structural Implications For Closed-Open Transitions. J. Biol. Chem. *285*, 10110–10121.

Kramer, R.H., Mourot, A., and Adesnik, H. (2013). Optogenetic pharmacology for control of native neuronal signaling proteins. Nat. Neurosci. *16*, 816–823.

Kumita, J.R., Smart, O.S., and Woolley, G.A. (2000). Photo-control of helix content in a short peptide. Proc. Natl. Acad. Sci. *97*, 3803–3808.

Kuo, Y.M., Zhou, B., Cosco, D., and Gitschier, J. (2001). The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 6836–6841.

Kusebauch, U., Cadamuro, S.A., Musiol, H.-J., Lenz, M.O., Wachtveitl, J., Moroder, L., and Renner, C. (2006). Photocontrolled Folding and Unfolding of a Collagen Triple Helix. Angew. Chem. Int. Ed. *45*, 7015–7018.

Kusebauch, U., Cadamuro, S.A., Musiol, H.-J., Moroder, L., and Renner, C. (2007). Photocontrol of the Collagen Triple Helix: Synthesis and Conformational Characterization of Bis-cysteinyl Collagenous Peptides with an Azobenzene Clamp. Chem. - Eur. J. *13*, 2966–2973.

Lam, H.-M., Chiu, J., Hsieh, M.-H., Meisel, L., Oliveira, I.C., Shin, M., and Coruzzi, G. (1998). Glutamate-receptor genes in plants. Nature *396*, 125–126.

Landry, Y., and Gies, J.-P. (2014). Pharmacologie - 3e édition: Des cibles à la thérapeutique (Dunod).

Langley, J.N. (1905). On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. J. Physiol. *33*, 374–413.

Lape, R., Colquhoun, D., and Sivilotti, L.G. (2008). On the nature of partial agonism in the nicotinic receptor superfamily. Nature *454*, 722–727.

Lazarowski, E.R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. Purinergic Signal. *8*, 359–373.

Lazarowski, E.R., Sesma, J.I., Seminario-Vidal, L., and Kreda, S.M. (2011). Molecular Mechanisms of Purine and Pyrimidine Nucleotide Release. In Advances in Pharmacology, (Elsevier), pp. 221–261.

Lemoine, D., Jiang, R., Taly, A., Chataigneau, T., Specht, A., and Grutter, T. (2012). Ligand-gated ion channels: new insights into neurological disorders and ligand recognition. Chem. Rev. *112*, 6285–6318.

Lester, H., Krouse, M., Nass, M., Wassermann, N., and Erlanger, B. (1980). A covalently bound photoisomerizable agonist. Comparison with reversibly bound agonists at electrophorus electroplaques. J. Gen. Physiol. *75*, 207–232.

Lester, H.A., Krouse, M.E., Nass, M.M., Wassermann, N.H., and Erlanger, B.F. (1979). Light-activated drug confirms a mechanism of ion channel blockade. Nature *280*, 509–510.

Levitz, J., Pantoja, C., Gaub, B., Janovjak, H., Reiner, A., Hoagland, A., Schoppik, D., Kane, B., Stawski, P., Schier, A.F., et al. (2013). Optical control of metabotropic glutamate receptors. Nat. Neurosci. *16*, 507–516.

Lewis, C.J., Surprenant, A., and Evans, R.J. (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. Br. J. Pharmacol. *124*, 1463–1466.

Li, Z. (2004). Gain and Loss of Channel Function by Alanine Substitutions in the Transmembrane Segments of the Rat ATP-Gated P2X2 Receptor. J. Neurosci. *24*, 7378–7386.

Li, M., Chang, T.-H., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2008). Gating the pore of P2X receptor channels. Nat. Neurosci. *11*, 883–887.

Li, M., Kawate, T., Silberberg, S.D., and Swartz, K.J. (2010). Pore-opening mechanism in trimeric P2X receptor channels. Nat. Commun. *1*, 1–7.

Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., and Feeney, P.J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Adv. Drug Deliv. Rev. *46*, 3–26.

Liu, M., King, B.F., Dunn, P.M., Rong, W., Townsend-Nicholson, A., and 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. J. Pharmacol. Exp. Ther. *296*, 1043–1050.

Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C., and Dahl, G. (2007). Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X7 receptor death complex. FEBS Lett. *581*, 483–488.

Lörinczi, É., Bhargava, Y., Marino, S.F., Taly, A., Kaczmarek-Hájek, K., Barrantes-Freer, A., Dutertre, S., Grutter, T., Rettinger, J., and Nicke, A. (2012). Involvement of the cysteine-rich head domain in activation and desensitization of the P2X1 receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 11396–11401.

Maillet, M. (2006). Biologie cellulaire (Elsevier Masson).

Maitre, B., Magnenat, S., Heim, V., Ravanat, C., Evans, R.J., de la Salle, H., Gachet, C., and Hechler, B. (2015). The P2X1 Receptor Is Required for Neutrophil Extravasation during Lipopolysaccharide-Induced Lethal Endotoxemia in Mice. J. Immunol. *194*, 739–749.

Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M., and Isacoff, E.Y. (1996). Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. Science *271*, 213–216.

Marc, R., Pfeiffer, R., and Jones, B. (2014). Retinal Prosthetics, Optogenetics, and Chemical Photoswitches. ACS Chem. Neurosci. *5*, 895–901.

Marquez-Klaka, B., Rettinger, J., Bhargava, Y., Eisele, T., and Nicke, A. (2007). Identification of an Intersubunit Cross-Link between Substituted Cysteine Residues Located in the Putative ATP Binding Site of the P2X1 Receptor. J. Neurosci. *27*, 1456–1466.

Massberg, S., Grahl, L., von Bruehl, M.-L., Manukyan, D., Pfeiler, S., Goosmann, C., Brinkmann, V., Lorenz, M., Bidzhekov, K., Khandagale, A.B., et al. (2010). Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity via neutrophil serine proteases. Nat. Med. *16*, 887–896.

Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G.C.R., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., and Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. Nat. Neurosci. *4*, 1086–1092.

Mayer, M.L. (2005a). Glutamate receptor ion channels. Curr. Opin. Neurobiol. *15*, 282–288.

Mayer, M.L. (2005b). Crystal Structures of the GluR5 and GluR6 Ligand Binding Cores: Molecular Mechanisms Underlying Kainate Receptor Selectivity. Neuron *45*, 539–552.

Michel, A.D., Clay, W.C., Ng, S.W., Roman, S., Thompson, K., Condreay, J.P., Hall, M., Holbrook, J., Livermore, D., and Senger, S. (2008). Identification of regions of the P2X7 receptor that contribute to human and rat species differences in antagonist effects. Br. J. Pharmacol. *155*, 738–751.

Migita, K. (2001). Polar Residues of the Second Transmembrane Domain Influence Cation Permeability of the ATP-gated P2X2 Receptor. J. Biol. Chem. *276*, 30934–30941.

Mihara, H., Boudaka, A., Sugiyama, T., Moriyama, Y., and Tominaga, M. (2011). Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse oesophageal keratinocytes: TRPV4 in mouse oesophageal keratinocytes. J. Physiol. *589*, 3471–3482.

Miller, P.S., and Smart, T.G. (2010). Binding, activation and modulation of Cys-loop receptors. Trends Pharmacol. Sci. *31*, 161–174.

Mio, K., Kubo, Y., Ogura, T., Yamamoto, T., and Sato, C. (2005). Visualization of the trimeric P2X2 receptor with a crown-capped extracellular domain. Biochem. Biophys. Res. Commun. *337*, 998–1005.

Mio, K., Ogura, T., Yamamoto, T., Hiroaki, Y., Fujiyoshi, Y., Kubo, Y., and Sato, C. (2009). Reconstruction of the P2X2 Receptor Reveals a Vase-Shaped Structure with Lateral Tunnels above the Membrane. Structure *17*, 266–275.

Moffatt, L., and Hume, R.I. (2007). Responses of Rat P2X2 Receptors to Ultrashort Pulses of ATP Provide Insights into ATP Binding and Channel Gating. J. Gen. Physiol. *130*, 183–201.

Monod, J., Wyman, J., and Changeux, J.P. (1965). ON THE NATURE OF ALLOSTERIC TRANSITIONS: A PLAUSIBLE MODEL. J. Mol. Biol. *12*, 88–118.

Mony, L., Krzaczkowski, L., Leonetti, M., Le Goff, A., Alarcon, K., Neyton, J., Bertrand, H.-O., Acher, F., and Paoletti, P. (2009). Structural Basis of NR2B-Selective Antagonist Recognition by N-Methyl-D-aspartate Receptors. Mol. Pharmacol. *75*, 60–74.

Mourot, A. (2005). Probing the Reorganization of the Nicotinic Acetylcholine Receptor during Desensitization by Time-Resolved Covalent Labeling Using [3H]AC5, a Photoactivatable Agonist. Mol. Pharmacol. *69*, 452–461.

Mourot, A., Kienzler, M.A., Banghart, M.R., Fehrentz, T., Huber, F.M.E., Stein, M., Kramer, R.H., and Trauner, D. (2011). Tuning Photochromic Ion Channel Blockers. ACS Chem. Neurosci. *2*, 536–543.

Mourot, A., Fehrentz, T., Feuvre, Y.L., Smith, C.M., Herold, C., Dalkara, D., Nagy, F., Trauner, D., and Kramer, R.H. (2012). Rapid optical control of nociception with an ion channel photoswitch. Nat. Methods *9*, 396–402.

Mourot, A., Tochitsky, I., and Kramer, R.H. (2013). Light at the end of the channel: optical manipulation of intrinsic neuronal excitability with chemical photoswitches. Front. Mol. Neurosci. *6*.

Muranaka, N., Hohsaka, T., and Sisido, M. (2002). Photoswitching of peroxidase activity by position-specific incorporation of a photoisomerizable non-natural amino acid into horseradish peroxidase. FEBS Lett. *510*, 10–12.

Murphy, N., and Lynch, M.A. (2012). Activation of the P2X7 receptor induces migration of glial cells by inducing cathepsin B degradation of tissue inhibitor of metalloproteinase 1. J. Neurochem. *123*, 761–770.

Nagata, K., Imai, T., Yamashita, T., Tsuda, M., Tozaki-Saitoh, H., and Inoue, K. (2009). Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. Mol. Pain *5*, 20.

Nagaya, N. (2005). An Intersubunit Zinc Binding Site in Rat P2X2 Receptors. J. Biol. Chem. *280*, 25982–25993.

Nakayama, K., Endo, M., and Majima, T. (2004). Photochemical regulation of the activity of an endonuclease BamHI using an azobenzene moiety incorporated site-selectively into the dimer interface. Chem. Commun. *21*, 2386–2387.

Nakazawa, K. (1994). ATP-activated current and its interaction with acetylcholine-activated current in rat sympathetic neurons. J. Neurosci. *14*, 740–750.

Neher, E., and Sakmann, B. (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. Nature *260*, 799–802.

Newbolt, A., Stoop, R., Virginio, C., Surprenant, A., North, R.A., Buell, G., and Rassendren, F. (1998). Membrane topology of an ATP-gated ion channel (P2X receptor). J. Biol. Chem. *273*, 15177–15182.

Nicke, A., Bäumert, H.G., Rettinger, J., Eichele, A., Lambrecht, G., Mutschler, E., and Schmalzing, G. (1998). P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. EMBO J. *17*, 3016–3028.

Noda, Shimizu, Tanabe, Takai, Kayano, Ikeda, Takahashi, Nakayama, Kanaoka, Minamino, et al. (1984). Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. Nature *312*, 121–127.

North, R.A. (2002). Molecular Physiology of P2X Receptors. Physiol. Rev. *82*, 1013–1067.

Le Novère, N., Corringer, P.-J., and Changeux, J.-P. (2002). The diversity of subunit composition in nAChRs: Evolutionary origins, physiologic and pharmacologic consequences. J. Neurobiol. *53*, 447–456.

Omran, Z., and Specht, A. (2009). Synthesis and photochemical properties of photo-cleavable crosslinkers. Tetrahedron Lett. *50*, 2434–2436.

Oury, C. (2002). P2X1-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 2 contributes to platelet secretion and aggregation induced by collagen. Blood *100*, 2499–2505.

Oury, C., Lecut, C., Hego, A., Wéra, O., and Delierneux, C. (2015). Purinergic control of inflammation and thrombosis: Role of P2X1 receptors. Comput. Struct. Biotechnol. J. *13*, 106–110.

Palmiter, R.D., and Huang, L. (2004). Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. *447*, 744–751.

Pankratov, Y.V., Lalo, U.V., and Krishtal, O.A. (2002). Role for P2X Receptors in Long-Term Potentiation. J. Neurosci. *22*, 8363–8369.

Paukert, M. (2004). Identification of the Ca2+ Blocking Site of Acid-sensing Ion Channel (ASIC) 1: Implications for Channel Gating. J. Gen. Physiol. *124*, 383–394.

Pelegrín, P. (2011). Many ways to dilate the P2X7 receptor pore: P2X7 and dye uptake. Br. J. Pharmacol. *163*, 908–911.

Pelegrin, P., and Surprenant, A. (2006). Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1β release by the ATP-gated P2X7 receptor. EMBO J. *25*, 5071–5082.

Pellegatti, P., Raffaghello, L., Bianchi, G., Piccardi, F., Pistoia, V., and Di Virgilio, F. (2008). Increased Level of Extracellular ATP at Tumor Sites: In Vivo Imaging with Plasma Membrane Luciferase. PLoS ONE *3*, e2599.

Pieroni, O., Fissi, A., Angelini, N., and Lenci, F. (2001). Photoresponsive Polypeptides. Acc. Chem. Res. *34*, 9–17.

Polosukhina, A., Litt, J., Tochitsky, I., Nemargut, J., Sychev, Y., De Kouchkovsky, I., Huang, T., Borges, K., Trauner, D., Van Gelder, R.N., et al. (2012). Photochemical restoration of visual responses in blind mice. Neuron *75*, 271–282.

Popova, M., Trudell, J., Li, K., Alkana, R., Davies, D., and Asatryan, L. (2013). Tryptophan 46 is a site for ethanol and ivermectin action in P2X4 receptors. Purinergic Signal. *9*, 621–632.

Pougnet, J. (2013). Régulation du trafic des récepteurs AMPA et de la plasticité synaptique induite par les récepteurs P2X. Bordeaux 2.

Pougnet, J.-T., Toulme, E., Martinez, A., Choquet, D., Hosy, E., and Boué-Grabot, E. (2014). ATP P2X Receptors Downregulate AMPA Receptor Trafficking and Postsynaptic Efficacy in Hippocampal Neurons. Neuron *83*, 417–430.

Pozhidaeva, N., Cormier, M.-E., Chaudhari, A., and Woolley, G.A. (2004). Reversible photocontrol of peptide helix content: adjusting thermal stability of the cis state. Bioconjug. Chem. *15*, 1297–1303.

Pratt, E.B., Brink, T.S., Bergson, P., Voigt, M.M., and Cook, S.P. (2005). Use-Dependent Inhibition of P2X3 Receptors by Nanomolar Agonist. J. Neurosci. *25*, 7359–7365.

Priel, A., and Silberberg, S.D. (2004). Mechanism of ivermectin facilitation of human P2X4 receptor channels. J. Gen. Physiol. *123*, 281–293.

Rapaport, E. (1988). Experimental cancer therapy in mice by adenine nucleotides. Eur. J. Cancer Clin. Oncol. *24*, 1491–1497.

Rassendren, F., Buell, G., Newbolt, A., North, R.A., and Surprenant, A. (1997). Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. EMBO J. *16*, 3446–3454.

Reiner, A., and Isacoff, E.Y. (2014). Tethered ligands reveal glutamate receptor desensitization depends on subunit occupancy. Nat. Chem. Biol. *10*, 273–280.

Renner, C., Cramer, J., Behrendt, R., and Moroder, L. (2000). Photomodulation of conformational states. II. Mono- and bicyclic peptides with (4-aminomethyl)phenylazobenzoic acid as backbone constituent. Biopolymers *54*, 501–514.

Richler, E., Shigetomi, E., and Khakh, B.S. (2011). Neuronal P2X2 receptors are mobile ATP sensors that explore the plasma membrane when activated. J. Neurosci. *31*, 16716–16730.

Ringer, S. (1882). Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. J. Physiol. *3*, 380–393.

Roberts, J.A., and Evans, R.J. (2006). Contribution of conserved polar glutamine, asparagine and threonine residues and glycosylation to agonist action at human P2X1 receptors for ATP. J. Neurochem. *96*, 843–852.

Roberts, J.A., and Evans, R.J. (2007). Cysteine Substitution Mutants Give Structural Insight and Identify ATP Binding and Activation Sites at P2X Receptors. J. Neurosci. *27*, 4072–4082.

Roberts, J.A., Digby, H.R., Kara, M., Ajouz, S.E., Sutcliffe, M.J., and Evans, R.J. (2008). Cysteine Substitution Mutagenesis and the Effects of Methanethiosulfonate Reagents at P2X2 and P2X4 Receptors Support a Core Common Mode of ATP Action at P2X Receptors. J. Biol. Chem. *283*, 20126–20136.

Roberts, J.A., Valente, M., Allsopp, R.C., Watt, D., and Evans, R.J. (2009). Contribution of the region Glu181 to Val200 of the extracellular loop of the human P2X1 receptor to agonist binding and gating revealed using cysteine scanning mutagenesis1. J. Neurochem. *109*, 1042–1052.

Roberts, J.A., Allsopp, R.C., El Ajouz, S., Vial, C., Schmid, R., Young, M.T., and Evans, R.J. (2012). Agonist binding evokes extensive conformational changes in the extracellular domain of the ATP-gated human P2X1 receptor ion channel. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 4663–4667.

Rokic, M.B., Stojilkovic, S.S., and Zemkova, H. (2014). Structural and functional properties of the rat P2X4 purinoreceptor extracellular vestibule during gating. Front. Cell. Neurosci. *8*.

Roux, B. (1999). The Cavity and Pore Helices in the KcsA K+ Channel: Electrostatic Stabilization of Monovalent Cations. Science *285*, 100–102.

Rul ek, L., and Vondrá e k, J. (1998). Coordination geometries of selected transition metal ions (Co2+, Ni2+, Cu2+, Zn2+, Cd2+, and Hg2+) in metalloproteins. J. Inorg. Biochem. *71*, 115–127.

Sadovski, O., Beharry, A.A., Zhang, F., and Woolley, G.A. (2009). Spectral Tuning of Azobenzene Photoswitches for Biological Applications. Angew. Chem. Int. Ed. *48*, 1484–1486.

Samanta, S., and Woolley, G.A. (2011). Bis-Azobenzene Crosslinkers for Photocontrol of Peptide Structure. ChemBioChem *12*, 1712–1723.

Samanta, S., Qin, C., Lough, A.J., and Woolley, G.A. (2012). Bidirectional Photocontrol of Peptide Conformation with a Bridged Azobenzene Derivative. Angew. Chem. Int. Ed. *51*, 6452–6455.

Samways, D.S.K., and Egan, T.M. (2007). Acidic Amino Acids Impart Enhanced Ca2+ Permeability and Flux in Two Members of the ATP-gated P2X Receptor Family. J. Gen. Physiol. *129*, 245–256.

Samways, D.S.K., Migita, K., Li, Z., and Egan, T.M. (2008). On the Role of the First Transmembrane Domain in Cation Permeability and Flux of the ATP-gated P2X2 Receptor. J. Biol. Chem. *283*, 5110–5117.

Samways, D.S.K., Khakh, B.S., Dutertre, S., and Egan, T.M. (2011). Preferential use of unobstructed lateral portals as the access route to the pore of human ATP-gated ion channels (P2X receptors). Proc. Natl. Acad. Sci. *108*, 13800–13805.

Samways, D.S.K., Li, Z., and Egan, T.M. (2014). Principles and properties of ion flow in P2X receptors. Front. Cell. Neurosci. *8*.

Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., and Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photo-switchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABAB signaling. Neuron *74*, 1005–1014.

Schierling, B., Noël, A.-J., Wende, W., Hien, L.T., Volkov, E., Kubareva, E., Oretskaya, T., Kokkinidis, M., Römpp, A., Spengler, B., et al. (2010). Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 1361–1366.

Schütt, M., Krupka, S.S., Milbradt, A.G., Deindl, S., Sinner, E.-K., Oesterhelt, D., Renner, C., and Moroder, L. (2003). Photocontrol of cell adhesion processes: model studies with cyclic azobenzene-RGD peptides. Chem. Biol. *10*, 487–490.

Seyfarth, E.-A. (2006). Julius Bernstein (1839-1917): pioneer neurobiologist and biophysicist. Biol. Cybern. *94*, 2–8.

Shrivastava, I.H., and Sansom, M.S. (2000). Simulations of ion permeation through a potassium channel: molecular dynamics of KcsA in a phospholipid bilayer. Biophys. J. *78*, 557–570.

Silberberg, S.D. (2005). Secondary Structure and Gating Rearrangements of Transmembrane Segments in Rat P2X4 Receptor Channels. J. Gen. Physiol. *125*, 347–359.

Silberberg, S.D., Li, M., and Swartz, K.J. (2007). Ivermectin Interaction with Transmembrane Helices Reveals Widespread Rearrangements during Opening of P2X Receptor Channels. Neuron *54*, 263–274.

Smart, T.G., and Paoletti, P. (2012). Synaptic Neurotransmitter-Gated Receptors. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *4*, a009662–a009662.

Snider, W.D., and McMahon, S.B. (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. Neuron *20*, 629–632.

Sobolevsky, A.I., Rosconi, M.P., and Gouaux, E. (2009). X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor. Nature *462*, 745–756.

Sokolova, E., Nistri, A., and Giniatullin, R. (2001). Negative cross talk between anionic GABAA and cationic P2X ionotropic receptors of rat dorsal root ganglion neurons. J. Neurosci. *21*, 4958–4968.

Stawski, P., Sumser, M., and Trauner, D. (2012). A Photochromic Agonist of AMPA Receptors. Angew. Chem. Int. Ed. *51*, 5748–5751.

Stein, M., Middendorp, S.J., Carta, V., Pejo, E., Raines, D.E., Forman, S.A., Sigel, E., and Trauner, D. (2012). Azo-Propofols: Photochromic Potentiators of GABAA Receptors. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *51*, 10500–10504.

Stelmashenko, O., Lalo, U., Yang, Y., Bragg, L., North, R.A., and Compan, V. (2012). Activation of Trimeric P2X2 Receptors by Fewer than Three ATP Molecules. Mol. Pharmacol. *82*, 760–766.

Stelmashenko, O., Compan, V., Browne, L.E., and North, R.A. (2014). Ectodomain Movements of an ATP-gated Ion Channel (P2X2 Receptor) Probed by Disulfide Locking. J. Biol. Chem. *289*, 9909–9917.

Stokes, L., Jiang, L.-H., Alcaraz, L., Bent, J., Bowers, K., Fagura, M., Furber, M., Mortimore, M., Lawson, M., Theaker, J., et al. (2006). Characterization of a selective and potent antagonist of human P2X7 receptors, AZ11645373. Br. J. Pharmacol. *149*, 880–887.

Stoop, R., Thomas, S., Rassendren, F., Kawashima, E., Buell, G., Surprenant, A., and North, R.A. (1999). Contribution of individual subunits to the multimeric P2X2 receptor: estimates based on methanethiosulfonate block at T336C. Mol. Pharmacol. *56*, 973–981.

Sumikawa, K., Houghton, M., Smith, J.C., Bell, L., Richards, B.M., and Barnard, E.A. (1982). The molecular cloning and characterisation of cDNA coding for the alpha subunit of the acetylcholine receptor. Nucleic Acids Res. *10*, 5809–5822.

Szymański, W., Beierle, J.M., Kistemaker, H.A.V., Velema, W.A., and Feringa, B.L. (2013). Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. Chem. Rev. *113*, 6114–6178.

Takai, E., Tsukimoto, M., Harada, H., Sawada, K., Moriyama, Y., and Kojima, S. (2012). Autocrine regulation of TGF-β1-induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptors in human lung cancer cells. J. Cell Sci. *125*, 5051–5060.

Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doère, M., and Linder, P. (2003). The Q Motif: A Newly Identified Motif in DEAD Box Helicases May Regulate ATP Binding and Hydrolysis. Mol. Cell *11*, 127–138.

Tasneem, A., Iyer, L.M., Jakobsson, E., and Aravind, L. (2004). Identification of the prokaryotic ligand-gated ion channels and their implications for the mechanisms and origins of animal Cys-loop ion channels. Genome Biol. *6*, R4.

Tittle, R.K., Power, J.M., and Hume, R.I. (2007). A Histidine Scan to Probe the Flexibility of the Rat P2X2 Receptor Zinc-binding Site. J. Biol. Chem. *282*, 19526–19533.

Tochitsky, I., Banghart, M.R., Mourot, A., Yao, J.Z., Gaub, B., Kramer, R.H., and Trauner, D. (2012). Optochemical control of genetically engineered neuronal nicotinic acetylcholine receptors. Nat. Chem. *4*, 105–111.

Toth-Zsamboki, E., Oury, C., Cornelissen, H., De Vos, R., Vermylen, J., and Hoylaerts, M.F. (2003). P2X1-mediated ERK2 Activation Amplifies the Collagen-induced Platelet Secretion by Enhancing Myosin Light Chain Kinase Activation. J. Biol. Chem. *278*, 46661–46667.

Trujillo, C.A., Nery, A.A., Martins, A.H.B., Majumder, P., Gonzalez, F.A., and Ulrich, H. (2006). Inhibition Mechanism of the Recombinant Rat $P2X_2$ Receptor in Glial Cells by Suramin and TNP-ATP †. Biochemistry (Mosc.) *45*, 224–233.

Tsuda, M., shigemoto-Mogami, Y., Koizumi, S., Mizokoshi, A., Kohsaka, S., Salter, M.W., and Inoue, K. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. Nature *424*, 778–783.

Tu, J., Le, G., and Ballard, H.J. (2010). Involvement of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the acidosis-induced efflux of ATP from rat skeletal muscle. J. Physiol. *588*, 4563–4578.

Ulmann, L., Hatcher, J.P., Hughes, J.P., Chaumont, S., Green, P.J., Conquet, F., Buell, G.N., Reeve, A.J., Chessell, I.P., and Rassendren, F. (2008). Up-Regulation of P2X4 Receptors in Spinal Microglia after Peripheral Nerve Injury Mediates BDNF Release and Neuropathic Pain. J. Neurosci. *28*, 11263–11268.

Umeki, N., Yoshizawa, T., Sugimoto, Y., Mitsui, T., Wakabayashi, K., and Maruta, S. (2004). Incorporation of an azobenzene derivative into the energy transducing site of skeletal muscle myosin results in photo-induced conformational changes. J. Biochem. (Tokyo) *136*, 839–846.

Valera, S., Hussy, N., Evans, R.J., Adami, N., North, R.A., Surprenant, A., and Buell, G. (1994). A new class of ligand-gated ion channel defined by P2x receptor for extracellular ATP. Nature *371*, 516–519.

Virginio, C., MacKenzie, A., Rassendren, F.A., North, R.A., and Surprenant, A. (1999). Pore dilation of neuronal P2X receptor channels. Nat. Neurosci. *2*, 315–321.

Volgraf, M., Gorostiza, P., Numano, R., Kramer, R.H., Isacoff, E.Y., and Trauner, D. (2006). Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. Nat. Chem. Biol. *2*, 47–52.

Volgraf, M., Gorostiza, P., Szobota, S., Helix, M.R., Isacoff, E.Y., and Trauner, D. (2007). Reversibly Caged Glutamate: A Photochromic Agonist of Ionotropic Glutamate Receptors. J. Am. Chem. Soc. *129*, 260–261.

Vollmer, M.S., Clark, T.D., Steinem, C., and Ghadiri, M.R. (1999). Photoswitchable Hydrogen-Bonding in Self-Organized Cylindrical Peptide Systems. Angew. Chem. Int. Ed Engl. *38*, 1598–1601.

Vulchanova, L., Arvidsson, U., Riedl, M., Wang, J., Buell, G., Surprenant, A., North, R.A., and Elde, R. (1996). Differential distribution of two ATP-gated channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *93*, 8063–8067.

De Vuyst, E., Wang, N., Decrock, E., De Bock, M., Vinken, M., Van Moorhem, M., Lai, C., Culot, M., Rogiers, V., Cecchelli, R., et al. (2009). Ca2+ regulation of connexin 43 hemichannels in C6 glioma and glial cells. Cell Calcium *46*, 176–187.

Wager, T.T., Hou, X., Verhoest, P.R., and Villalobos, A. (2010). Moving beyond Rules: The Development of a Central Nervous System Multiparameter Optimization (CNS MPO) Approach To Enable Alignment of Druglike Properties. ACS Chem. Neurosci. *1*, 435–449.

Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J. (1982). Distantly related sequences in the alpha-and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. EMBO J. *1*, 945.

Wang, L., Östberg, O., Wihlborg, A.-K., Brogren, H., Jern, S., and Erlinge, D. (2003). Quantification of ADP and ATP receptor expression in human platelets. J. Thromb. Haemost. *1*, 330–336.

Wang, Y., Zhang, X., Guo, Q.-L., Zou, W.-Y., Huang, C.-S., and Yan, J.-Q. (2010). Cyclooxygenase inhibitors suppress the expression of P2X3 receptors in the DRG and attenuate hyperalgesia following chronic constriction injury in rats. Neurosci. Lett. *478*, 77–81.

Wei, W., Ryu, J.K., Choi, H.B., and McLarnon, J.G. (2008). Expression and function of the P2X7 receptor in rat C6 glioma cells. Cancer Lett. *260*, 79–87.

Werner, P., Seward, E.P., Buell, G.N., and North, R.A. (1996). Domains of P2X receptors involved in desensitization. Proc. Natl. Acad. Sci. *93*, 15485–15490.

White, N., and Burnstock, G. (2006). P2 receptors and cancer. Trends Pharmacol. Sci. *27*, 211–217.

Wilkinson, W.J., Jiang, L.-H., Surprenant, A., and North, R.A. (2006). Role of Ectodomain Lysines in the Subunits of the Heteromeric P2X2/3 Receptor. Mol. Pharmacol. *70*, 1159–1163.

Wolf, C., Rosefort, C., Fallah, G., Kassack, M.U., Hamacher, A., Bodnar, M., Wang, H., Illes, P., Kless, A., Bahrenberg, G., et al. (2011). Molecular Determinants of Potent P2X2 Antagonism Identified by Functional Analysis, Mutagenesis, and Homology Docking. Mol. Pharmacol. *79*, 649–661.

Woolley, G.A., Jaikaran, A.S.I., Berezovski, M., Calarco, J.P., Krylov, S.N., Smart, O.S., and Kumita, J.R. (2006). Reversible photocontrol of DNA binding by a designed GCN4-bZIP protein. Biochemistry (Mosc.) *45*, 6075–6084.

Wu, G., Whiteside, G.T., Lee, G., Nolan, S., Niosi, M., Pearson, M.S., and Ilyin, V.I. (2004). A-317491, a selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, reverses inflammatory mechanical hyperalgesia through action at peripheral receptors in rats. Eur. J. Pharmacol. *504*, 45–53.

Wyart, C., Bene, F.D., Warp, E., Scott, E.K., Trauner, D., Baier, H., and Isacoff, E.Y. (2009). Optogenetic dissection of a behavioral module in the vertebrate spinal cord. Nature *461*, 407–410.

Yamamoto, K., Furuya, K., Nakamura, M., Kobatake, E., Sokabe, M., and Ando, J. (2011). Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca2+ waves at caveolae in vascular endothelial cells. J. Cell Sci. *124*, 3477–3483.

Yan, Z., Liang, Z., Obsil, T., and Stojilkovic, S.S. (2006). Participation of the Lys313-Ile333 Sequence of the Purinergic P2X4 Receptor in Agonist Binding and Transduction of Signals to the Channel Gate. J. Biol. Chem. *281*, 32649–32659.

Yan, Z., Li, S., Liang, Z., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2008). The P2X7 Receptor Channel Pore Dilates under Physiological Ion Conditions. J. Gen. Physiol. *132*, 563–573.

Young, M.T., Fisher, J.A., Fountain, S.J., Ford, R.C., North, R.A., and Khakh, B.S. (2008a). Molecular Shape, Architecture, and Size of P2X4 Receptors Determined Using Fluorescence Resonance Energy Transfer and Electron Microscopy. J. Biol. Chem. *283*, 26241–26251.

Young, M.T., Zhang, Y.-H., Cao, L., Broomhead, H., and Jiang, L.-H. (2008b). Role of the domain encompassing Arg304–Ile328 in rat P2X2 receptor conformation revealed by alterations in complex glycosylation at Asn298. Biochem. J. *416*, 137.

Yue, L., Pawlowski, M., Dellal, S.S., Xie, A., Feng, F., Otis, T.S., Bruzik, K.S., Qian, H., and Pepperberg, D.R. (2012). Robust photo-regulation of GABAA receptors by allosteric modulation with a propofol analog. Nat. Commun. *3*, 1095.

Zemkova, H., Yan, Z., Liang, Z., Jelinkova, I., Tomic, M., and Stojilkovic, S.S. (2007). Role of aromatic and charged ectodomain residues in the P2X4 receptor functions. J. Neurochem. *102*, 1139–1150.

Zhang, F., Zarrine-Afsar, A., Al-Abdul-Wahid, M.S., Prosser, R.S., Davidson, A.R., and Woolley, G.A. (2009). Structure-Based Approach to the Photocontrol of Protein Folding. J. Am. Chem. Soc. *131*, 2283–2289.

Zhang, F., Timm, K.A., Arndt, K.M., and Woolley, G.A. (2010). Photocontrol of Coiled-Coil Proteins in Living Cells. Angew. Chem. Int. Ed. *49*, 3943–3946.

Zhang, Z., Burns, D.C., Kumita, J.R., Smart, O.S., and Woolley, G.A. (2003). A Water-Soluble Azobenzene Cross-Linker for Photocontrol of Peptide Conformation. Bioconjug. Chem. *14*, 824–829.

Zhao, W.-S., Wang, J., Ma, X.-J., Yang, Y., Liu, Y., Huang, L.-D., Fan, Y.-Z., Cheng, X.-Y., Chen, H.-Z., Wang, R., et al. (2014). Relative motions between left flipper and dorsal fin domains favour P2X4 receptor activation. Nat. Commun. *5*, 4189.

Zhou, X., and Galligan, J.J. (1998). Non-additive interaction between nicotinic cholinergic and P2X purine receptors in guinea-pig enteric neurons in culture. J. Physiol. *513*, 685–697.

Chloé HABERMACHER

Exploration structurale et dynamique du phénomène d'activation des récepteurs P2Xs par de nouveaux outils optochimiques

RESUME

Au sein des récepteurs canaux, les récepteurs trimériques P2Xs cations non-sélectifs, activés par l'ATP extracellulaire, sont impliqués dans de nombreux processus physio(patho)logiques et représentent, par conséquent, des cibles thérapeutiques majeures. Leur étude souffre néanmoins d'un manque de molécules pharmacologiques permettant d'activer sélectivement les différents sous-types dans leur environnement natif. La résolution de structures cristallographiques a, certes, permis une avancée fondamentale dans la compréhension à l'échelle moléculaire de ces récepteurs, mais les mécanismes impliqués dans les transitions vers les différents états allostériques restent encore putatifs et la structure de l'état ouvert demande encore à être améliorée.

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons développé des outils optochimiques innovants, dérivés d'azobenzènes, permettant une maîtrise spatiale et temporelle inégalée de la fonctionnalité du récepteur. D'une part, un outil dérivé d'une stratégie de pharmacologie optogénétique, pour contrôler l'activité d'un récepteur ingénieré afin de palier au manque de sélectivité des molécules existantes. D'autre part, le développement d'une sonde moléculaire capable d'induire des mouvements entre des résidus au sein de la protéine et ainsi, d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de l'activation.

Ces derniers travaux nous ont permis de proposer un nouveau mécanisme d'activation du récepteur. Du fait de la relative simplicité des molécules utilisées, ces deux outils pourraient être utilisés sur d'autres cibles pour des investigations moléculaires et physiologiques.

MOTS-CLES : P2XR, azobenzènes, optogating, sonde moléculaire

ABSTRACT

Cationic non-selective trimeric receptors named P2Xs are activated by extracellular ATP; they pertain to the ligand-gated ion channels (LGICs), and are implicated in a diverse range of physio(patho)logical processes. They are therefore promising therapeutic targets. Major shortcomings of their study have fuelled from the lack of pharmacological tools selective of one subtype only. Recent X-ray structures provided a molecular framework on how ATP binding triggers channel opening. However, mechanisms by which the receptor switches between different conformational states remain elusive and additional experimental data are needed to improve the ATP-bound structure.

During this PhD, we have developed novel optochemical tools based on azobenzene derivatives, to obtain a spatiotemporal control of the functionality of the receptor. First, inspired by optogenetic pharmacology, we have designed an engineered receptor to control electrical activity of cultured rat hippocampal neurons. Second, molecular photo-switchable tweezers have been developed to explore allosteric transitions of the protein and giving new insights into the P2X pore gating mechanism. This last approach provides data enabling us to purpose a new model of the active state. The versatility of the two strategies makes these tools promising for the molecular and physiological studies of other membrane proteins.

KEYWORDS : P2XR, azobenzene, optogating, photo-switchable tweezers