



HAL
open science

Étude de la régulation et de la diversité combinatoire des canaux potassiques à deux domaines P de la sous famille TREK

Yannick Comoglio

► **To cite this version:**

Yannick Comoglio. Étude de la régulation et de la diversité combinatoire des canaux potassiques à deux domaines P de la sous famille TREK. Sciences agricoles. Université Côte d'Azur, 2016. Français. NNT : 2016AZUR4089 . tel-01462864

HAL Id: tel-01462864

<https://theses.hal.science/tel-01462864>

Submitted on 9 Feb 2017

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 Nice Sophia Antipolis

membre de l'UNIVERSITE CÔTE D'AZUR

Ecole doctorale 85: Sciences de la Vie et de la Santé
UFR Faculté des Sciences
Unité de recherche: CNRS UMR7277

THESE de DOCTORAT

Présentée pour obtenir le titre de
Docteur en Sciences de la Vie
de l'Université Côte d'Azur

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

Par

Comoglio Yannick

Etude de la régulation et de la diversité combinatoire des canaux potassiques à deux domaines P de la sous famille TREK.

Thèse dirigée par le docteur **Guillaume Sandoz**
Soutenue le 4 novembre 2016

Devant le Jury composé de :

M. Jacques Noël	Professeur	Président
M. Nicolas Vitale	Docteur	Rapporteur
M. Michel Ronjat	Docteur	Rapporteur
M. Michel Vivaudou	Docteur	Examineur
M. Guillaume Sandoz	Docteur	Directeur de thèse

A mes deux amours

Eléonore et Daphné vous êtes les anges de ma vie.

Remerciements

Pour commencer je remercie particulièrement le docteur Guillaume Sandoz, pour m'avoir permis de réaliser une thèse dans son équipe, travaillé sur l'électrophysiologie et l'optogénétique fut un plaisir. Merci de m'avoir donné les outils nécessaires à la réalisation de ce travail et de m'avoir fait connaître le métier de chercheur et toutes ses implications.

Je souhaite remercier grandement les docteurs Nicolas Vitale, Michel Vivaudou, Michel Ronjat et le professeur Jacques Noël pour avoir accepté de juger mon travail de thèse ainsi que de l'honneur qu'ils me font de participer à ce jury de thèse.

Une grand merci aux autres membres passés et présents de l'équipe B.I.C avec qui j'ai passé de bons moments au travail comme à l'extérieur.

Merci à Brigitte Wdziekonski pour son aide et sa patience quotidienne, merci pour toutes ces cellules et constructions qui m'ont été vitales tout au long de la thèse. Merci pour toutes ces petites aides qui nous facilitent énormément la vie au labo.

Merci à Perrine Royal, pour ces bons moments à travailler ensemble. Travailler avec toi en tant que stagiaire puis thésarde fut très agréable. Tu passeras le bonjour aux xénopes pour moi.

Thanks to Dr Rayan Arant, the american guy. Thanks to improve my English and for all the discussions about science or not. My last question is who will die in G.O.T ?

Merci au Dr Céline Nicolas de m'avoir montré comment s'occuper des souris et les différentes manipulations possibles. Travailler avec toi fut très sympathique.

Merci aux différents stagiaires (Céline, Clémence, Stephan, Elodie, Clara et Mathieu) qui ont travaillé avec moi au cours de ces trois années, j'espère vous avoir appris deux trois trucs, comme moi j'ai appris de vous.

Je n'oublie pas les autres personnes du 4ème niveau de SN.

Merci à l'équipe Régulation des canaux ioniques dans les cancers.

Merci au docteur Olivier Soriani, tout d'abord pour les différents cours toujours très intéressants que j'ai pu suivre à la fac, puis pour tous les conseils promulgués durant ma thèse en électrophysiologie. Maintenant je connais la différence entre digital et analogique.

Merci au docteur Raphael Rapetti-Mauss. Merci pour tous ces bons moments passés en salle d'électrophysio et à l'extérieur. Je te souhaite que tout se passe pour le mieux pour la suite et au pire des cas on leur cassera les jambes.

Merci aux docteurs Franck Borgese et Hélène Guizouarn pour les différentes aides qu'ils ont pu me donner au cours de la thèse ainsi que du temps qu'ils m'ont accordé pour écouter mes présentations.

Merci à Bernard Pellissier pour m'avoir montré comment fonctionne la salle de culture et tous ces petits matériels cachés dans les tiroirs qui m'ont aidé à un moment ou un autre.

Merci à Sonia Marchal pour les agréables moments passés en salle de patch cela même si nos goûts musicaux sont opposés.

Je remercie aussi les membres de l'équipe Biologie du système circadien.

Merci aux professeurs Franck Delaunay et Michèle Teboul et au docteur Aline Grechez-Cassiau pour les différents cours qu'ils ont pu me donner à l'université. Merci aussi pour m'avoir montré "l'autre côté du miroir" en me permettant d'être chargé d'enseignement lors de vos travaux pratiques.

Merci à Céline Feillet pour toutes ces discussions que l'on a pu avoir, merci aussi de m'avoir plusieurs fois écouté pour mes présentations et autres.

Merci aussi à Sophie Guérin pour l'aide qu'elle a pu m'apporter à un moment ou un autre. Enfin merci à Pierre Leclere et Anthony Ruberto pour les bons moments passés à l'étage, courage les gars.

Je tiens à remercier les autres thésards de l'IBV, pour leur soutien lors des présentations et les discussions que l'on a pu avoir. Merci tout particulier à Cécile Giordano pour les bons moments passés lors de la pose repas ainsi que de nous avoir plusieurs fois ramené à la maison.

Je remercie le 5ème étage de biochimie pour m'avoir prêté si souvent leur table à manger et m'avoir accepté à l'étage.

Merci aussi au service de Milieux Stérilisation du bâtiment SN, Olga, Santhi et Mouna, merci pour votre bonne humeur quotidienne et votre patience.

Merci aux personnes de l'administration qui ont toujours su répondre à mes questions.

Je remercie également toutes les personnes que je considère comme des amis, Jonathan, Jo, Benjamin, Julien, Précillia, qui m'ont accompagné pendant ces trois ans et pour toutes les soirées que l'on a faites ensemble. Merci à Précillia pour avoir pris le temps de corriger une partie de ma thèse.

Merci aussi à toute ma famille, qui m'a soutenue pendant toute la thèse et qui a toujours cru en moi.

Merci à Google et Kenora, mes loulous, qui répondent toujours présent et pour toute la tendresse qu'ils m'ont donné et qu'ils me donnent au quotidien.

Enfin je remercie tout particulièrement et grandement Eleonora Meschi, mon amour, qui m'accompagne maintenant depuis sept ans et demi. Merci à toi sans qui rien n'aurait été possible, merci de m'avoir soutenu, merci pour toutes les aides que tu m'as donné tant au niveau scientifique que personnel. Merci pour ton amour.

Merci à Daphné mon petit trésor, qui a illuminé cette fin de thèse.

Résumé

Les canaux potassiques à deux domaines pore (K_{2p}) sont à l'origine d'un courant dit de fuite ou de fond, décrit par Hodgkin et Huxley dans les années 1950. Ces canaux ont une fonction pivot dans l'établissement du potentiel de membrane cellulaire et dans le contrôle de l'excitabilité neuronale. Leur activité basale conduit le potentiel de membrane à des valeurs proches du potentiel d'équilibre du potassium (-90 mV) et donc réduit l'excitabilité cellulaire. Ils jouent un rôle central dans la réponse de la cellule à divers signaux extra et intracellulaires. Durant ma thèse, je me suis intéressé plus particulièrement à la sous famille TREK dont les membres, TREK-1, TREK-2 et TRAAK, sont fortement exprimés dans le système nerveux central et périphérique où ils jouent notamment un rôle dans la nociception, la dépression et la neuroprotection. Leur activité est finement régulée par différents stimuli i) les agents physiques comme l'augmentation de la température, le stress mécanique et le gonflement cellulaire, ii) les agents chimiques comme l'acidification intracellulaire, l'alcalinisation du milieu extracellulaire, les phospholipides tel que l'acide phosphatidique, l'acide arachidonique et autres acides gras polyinsaturés, iii) les agents pharmacologiques tels que le riluzole ou les anesthésiques volatils, et iv) les neurotransmetteurs via les récepteurs couplés aux protéines G. Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à deux nouveaux modes de régulation de ces canaux et étudié leur capacité à hétéromériser pour augmenter la diversité fonctionnelle.

Dans un premier temps, j'ai étudié la régulation spécifique du canal TREK-1 par la phospholipase D2 (PLD2). J'ai pu mettre en évidence que TREK-1 et TREK-2, mais pas TRAAK, interagissent avec la PLD2 permettant une synthèse locale d'acide phosphatidique (PA). Ainsi les canaux TREK-1/2, mais pas TRAAK, sont inclus dans un microenvironnement riche en acide phosphatique qui potentialise leur activité basale. Nous avons montré que cette régulation tonique du canal se produit dans les tissus natifs (neurones hippocampiques). Ce mécanisme explique comment un phospholipide peut spécifiquement agir sur une cible donnée par synthèse locale et permet d'expliquer la sensibilité de TREK-1 vis-à-vis de l'éthanol qui agit en perturbant ce microdomaine riche en PA.

La seconde étude a porté sur l'hétérodimérisation des membres de la sous famille TREK. Nous avons pu mettre en évidence, grâce à des techniques de fluorescence en molécules uniques (méthodes d'immunoprecipitation de complexes protéiques unitaires et de colocalisation de molécule unique), que les sous-unités TREK-1, TREK-2 et TRAAK peuvent hétérodimériser entre elles. Elles forment par ce biais des canaux avec de nouvelles propriétés augmentant ainsi la diversité fonctionnelle de la famille.

Enfin j'ai étudié le mécanisme d'action d'une toxine bactérienne, la mycolactone, sur le canal TRAAK. Lors de la première partie du projet, nous avons montré que cette toxine est impliquée dans l'hyperpolarisation des fibres nociceptrices induisant une analgésie suite à l'activation de TRAAK via l'activation du récepteur AT2R par la mycolactone. Je me suis par la

suite intéressé à la voie de signalisation impliquée dans le couplage AT2R/TRAAK. Nos données montrent que la voie de signalisation induite par la fixation de la mycolactone est non canonique. En effet, elle est indépendante des protéines G. Enfin cette régulation est spatialement délimitée suggérant ainsi un couplage direct entre le canal TRAAK et le récepteur AT2R.

Ainsi, ce projet de thèse a permis de mettre en évidence de nouvelles régulations des canaux de la sous famille TREK ainsi que leur capacité à hétéromériser.

Mots clefs:

- 1: Canaux Potassiques à deux domaines Pore
- 2: Sous-famille TREK
- 3: Microdomaine de régulation
- 4: Hétéromérisation
- 5: Phospholipase D2
- 6: Mycolactone
- 7: Récepteur Angiotensine Type II

Abstract

Two-pore potassium channels are involved in the generation of the leak current, originally described by Hodgkin and Huxley in 1952. These channels are the key potassium current which set the resting membrane potential and play a significant role in cell excitability. My PhD work focused on a subfamily of two-pore potassium channels, called TREK (TREK-1, TREK-2 and TRAAK). TREK channels are expressed in the central and peripheral nervous system where they have been implicated to play a role in nociception, depression and neuroprotection. The activity of these channels is finely tuned by several types of stimuli, namely *i*) physical stimuli, such as temperature and mechanical forces, *ii*) chemical agents, such as phospholipids and intra- and extracellular pH, *iii*) pharmacological agents, such as Riluzole and volatile anesthetics, and *iv*) neurotransmitters via G protein-coupled receptors. I discovered two novel regulators of TREK channels, namely phospholipase D2 (PLD2) and angiotensin-2 receptor type II (AT2R), and I have studied the capacity of the different members of the TREK subfamily to form heterodimers.

I observed that treating cells expressing TREK channels with ethanol resulted in diminished potassium current. Given that TREK channels are regulated by phospholipids and that ethanol is known to inhibit PLD2 activity, I investigated if PLD2 might regulate TREK channel activity via phosphatidic acid (PA) production. I discovered that TREK-1 and TREK-2, but not TRAAK, directly interacts with PLD2, and that locally produced PA accumulates in a PA-rich microenvironment. I found that PA tonically potentiates the basal activity of TREK-1 and TREK-2 channels, and I have shown that this regulation is physiologically relevant in hippocampal neurons. These results are the first explanation for how a second messenger can specifically regulate an ion channel.

In collaboration with the lab of Priscille Brodin, we studied the action of the mycobacterial toxin, mycolactone, and its capability to regulate the TRAAK channel. We have demonstrated that mycolactone induces a hyperpolarization of nociceptive neurons, and that this hyperpolarization is due to the activation of TRAAK channels by mycolactone via AT2R. We found that mycolactone works via a non-canonical pathway, independent of G-proteins, and that there is a direct interaction between TRAAK and AT2R.

Finally, I have asked whether heteromerization of the different members of the TREK subfamily can play a role in increasing the functional diversity of TREK channels. Using single-molecule techniques, we have shown that TREK-1, TREK-2 and TRAAK can non-preferentially heterodimerize and that heterodimers show novel properties which are not present in homodimers.

Keywords:

1: Two-pore potassium channel **2:** TREK subfamily **3:** Micro-regulatory domain **4:** Heterodimerization **5:** Phospholipase D2 **6:** Mycolactone **7:** Angiotensin-2 receptor type II

Sommaire

Abréviations	
Liste des acides aminés	
Liste des figures	
Liste des équations	
Avant-propos	1
I-Introduction	4
I.1 La grande famille des canaux potassiques	4
I.1.1 Structure générale	4
I.1.2 La boucle P: Filtre de sélectivité au K^+	5
I.1.2.1 Structure et site de fixation	6
I.1.2.2 Conductance	6
I.1.3 Les grandes familles de canaux K^+	7
I.1.3.1 Canaux à 6/7 domaines transmembranaires	7
I.1.3.1.1 Les K_v	7
I.1.3.1.2 Les K_{Ca} , Slo ou "Big" potassium (BK) channels.....	12
I.1.3.1.3 La famille des canaux à faible conductance K^+ (SK_{Ca} (S pour Small), K_{Ca2})	13
I.1.3.2 Canaux à deux domaines transmembranaires: Les K_{ir}	14
I.1.3.2.1 Les K_{ir} dits Classiques ou $K_{ir}2.X$	15
I.1.3.2.2 Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G (K_G) ou $K_{ir}3.X$	15
I.1.3.2.3 Les canaux sensibles à l'ATP ou $K_{ir}6.X$	16
I.1.3.2.4 Les canaux à rectification entrante activés par l'ATP et les autres K_{ir} ou $K_{ir}1.1$, $K_{ir}4.X$ (1 et 2), $K_{ir}5.1$ et $K_{ir}7.1$	18
I.1.3.3 TMEM175.....	18
I.2 Les canaux Potassiques à deux domaines P K_{2p}	18
I.2.1 Les courants de fuites	18
I.2.2 Les canaux K_{2p}	20
I.2.3 Est-ce bien des canaux de fuite?	20
I.2.4 Diversité des K_{2p}	22
I.2.4.1 Classification	22
I.2.4.2 Sous-famille TWIK	23
I.2.4.2.1 TWIK1	23
I.2.4.2.2 TWIK2	24
I.2.4.2.3 KCNK7.....	25
I.2.4.3 TASK: sensible à l'acidité extracellulaire	25
I.2.4.3.1 Régulations.....	25
I.2.4.3.2 Rôles physiologiques	27
I.2.4.4 TALK sensible au pH basique	28
I.2.4.4.1 Régulations.....	28
I.2.4.4.2 Rôles physiologiques	29
I.2.4.5 THIK sensible à l'halothane	30
I.2.4.5.1 Rôles physiologiques	31

I.2.4.6 TRESK l'isolé	31
I.2.4.6.1 Régulations.....	32
I.2.4.6.2 Rôles physio- et pathologiques	32
I.2.4.7 L'hétéromérisation des K_{2p}	33
I.2.4.7.1 Le premier hétéromère TASK-1/TASK-2.....	33
I.2.4.7.2 THIK-1 et THIK-2	34
I.2.4.7.3 TWIK-1 et TREK-1	34
I.2.4.7.4 La sous-famille TREK	34
I.3 La sous-famille TREK	35
I.3.1 TREK-1 et TREK-2	35
I.3.1.1 Caractéristiques générales.....	35
I.3.1.2 Variants d'épissage.	36
I.3.1.3 Variation du site de traduction	36
I.3.1.4 Distribution	37
I.3.1.5 Rôles dans le système nerveux central	38
I.3.1.5.1 Transmission synaptique.....	38
I.3.1.5.2 Dépression	39
I.3.1.5.3 Neuroprotection	41
I.3.1.5.4 Dans l'anesthésie	42
I.3.1.5.5 Barrière hémato-encéphalique, blood-brain barrier (BBB).....	42
I.3.1.6 Rôles dans le système nerveux périphérique	43
I.3.1.6.1 Douleur	43
I.3.1.7 Rôles au niveau périphérique	44
I.3.1.7.1 Dans le système cardiovasculaire	44
I.3.1.7.2 Le myomètre	44
I.3.1.7.3 Les cancers	45
I.3.1.8 Régulation	45
I.3.1.8.1 Mécanosensibilité	46
I.3.1.8.2 Thermo-sensibilité	47
I.3.1.8.3 Sensibilité au pH.....	49
I.3.1.8.4 Sensibilité aux lipides	50
I.3.1.8.5 Régulation par les neurotransmetteurs et les récepteurs couplés aux protéines G.....	52
I.3.1.8.6 Les partenaires des canaux TREK	53
I.3.1.8.7 Pharmacologie	55
I.3.2 TRAAK	57
I.3.2.1 Caractéristiques générales.....	57
I.3.2.1.1 Isoformes	57
I.3.2.1.2 Distribution	57
I.3.2.2 Rôles physiologiques.....	58
I.3.2.2.1 Douleur	58
I.3.2.2.2 Rôle dans le cerveau et la neuroprotection	59
I.3.2.2.3 Au niveau périphérique.....	59
I.3.2.3 Régulation	59
I.3.2.3.1 Mécanosensibilité	59
I.3.2.3.2 Acide arachidonique et phospholipides	60
I.3.2.3.3 Pharmacologie	61
I.3.2.3.4 Thermo-sensibilité	61

I.3.2.3.5 Sensibilité au pH.....	61
I.3.2.3.6 Régulation par les GPCRs	61
I.3.2.3.7 Partenaires de TRAAK	62
I.3.3 Structure générale des canaux TREK	63
I.3.3.1 Structure de base.....	63
I.3.3.1.1 Les 2 conformations:.....	64
I.3.3.1.2 Les fenêtres latérales:.....	64
I.3.3.2 « Gating » des K_{2p}	65
I.3.3.2.1 Régulation du filtre de sélectivité:	65
I.3.3.2.2 Régulation via le chapeau extracellulaire	65
I.3.3.2.3 Régulation via les fenêtres latérales	65
II Résultats.....	66
II.1 ARTICLE 1 : La régulation spécifique de TREK-1 par la phospholipase D2 via une interaction directe et la production locale d'acide phosphatidique.....	66
II.1.1 Introduction	66
II.1.1.1 Phospholipides et canaux	66
II.1.2 Article	67
II.1.3 Discussion	74
II.1.3.1 La régulation des K_{2p} par les phospholipides	74
II.1.3.2 Implication physiologique.....	75
II.1.3.3 Brevet.....	76
II.2 ARTICLE 2 : L'hétéromérisation entre les membres de la sous-famille TREK produit une famille diversifiée de canaux potassiques hautement régulée.....	78
II.2.1 Introduction	78
II.2.1.1 Problématiques de l'étude des hétéromères chez les K_{2p}	78
II.2.1.2 Le SIMPull.....	78
II.2.1.3 Colocalisation à l'échelle de la molécule unique par fluorescence	79
II.2.1.4 Le projet.....	80
II.2.2 Article	80
II.2.3 Discussion	87
II.3 ARTICLE 3 : Une toxine mycobactérienne induit une analgésie dans l'ulcère de Buruli en ciblant la voie de signalisation de l'angiotensine.	89
II.3.1 Introduction	89
II.3.1.1 Une meilleure compréhension des mécanismes: Implication des canaux ioniques / K_{2p}	89
II.3.1.2 L'ulcère de Buruli et le mycolactone: Une régulation originale de la douleur	90
II.3.2 Article	90
II.3.3 Conclusion	103
II.3.4 La régulation de TRAAK par AT2R: Une voie de signalisation non conventionnelle.....	104
II.3.4.1 AT2R.....	104
II.3.4.2 Résultats	105
II.3.4.2.1 Effet de la mycolactone sur la régulation de TRAAK via AT2R.	105
II.3.4.2.2 Etude pharmacologique de la régulation de TRAAK par AT2R.....	107
II.3.4.2.3 Spécificité d'action	111
II.3.4.2.4 Caractérisation de la voie de signalisation induite par la Mycolactone.....	111
II.3.4.3 Conclusion.....	116

III Discussion	119
III.1 TREK-1 et PLD2	119
III.1.1 Potentiel implication dans l'addiction	119
III.1.2 Implication dans la croissance	120
III.2 Hétéromérisation	120
III.2.1 TREK-1/TREK-2 un nouveau senseur du pH extracellulaire	121
III.2.2 Implication de l'hétéromérisation des K_{2p}	121
III.3 TRAAK et Mycolactone	123
IV Perspectives.....	124
Liste des publications	126
Liste des brevets	126
Bibliographie	127
Annexe 1 (Matériels et méthodes).....
Annexe 2 (Brevet 1).....
Annexe 3 (Brevet 2).....

Abréviations

4-AP	4-aminopyridine
5-HT	sérotonine
AA	Acide arachidonique
ACh	Acétylcholine
ADP	Adenosine-di-phosphate
AKAP	A-kinase-anchoring protein
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
AngII	Angiotensine II
AP	Acide phosphatidique
ARN	Acide ribonucléique
AT1R	Récepteur à l'angiotensine de type I
AT2R	Récepteur à l'angiotensine de type II
ATP	Adenosine-tri-phosphate
ChTx	Charybdotoxine
COP1	Coatomerprotein complex 1
DAG	diacylglycérol
DRG	Noyaux de la racine dorsale
DRN	Noyau dorsal du raphé
FRET	Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes
GABA	Acide γ aminobutyrique
GFP	Green fluorescent protein
GHK	Goldman, Hodgkin et Huxley
HEK	Human Embryonic Kidney
IbTX	Ibériotoxine
IC ₅₀	Concentration inhibitrice médiane
IsoK	Condition de symétrie en K ⁺
KCNE1	K ⁺ voltage-gated channel subfamily member E1
KO	Knock Out
LPA	Lysophospholipides
mAHP	medium afterhyperpolarization
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
Myco	Mycolactone
NMDA	N-Methyl D-Aspartate
NO	Monoxyde d'azote
P ₀	Probabilité d'ouverture
PEtOh	Phosphatidiléthanol
PGE ₂	prostaglandine E2

pH _{ext}	pH extracellulaire
pH _{int}	pH intracellulaire
PIP ₂	Phosphatidyl inositol diphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PLD2	Phospholipase D2
PPSI	Potentiels post synaptiques inhibiteurs
PUFAs	Acides gras polyinsaturés
RCPG	Récepteur couple aux protéines G
RVD	Regulatory volume decrease
SiMPull	Single molecule pull down
SNC	Système nerveux central
SSRIs	Inhibiteurs de la recapture de la 5-HT
TEA	Tétraethylammonium
TIRF	Total internal reflection fluorescence
TTX	Tétradotoxine
VSD	Voltage-sensitive domain

Liste des acides aminés

Nom	Code à une lettre	Code à trois lettres
Alanine	L	Ala
Arginine	R	Arg
Asparagine	N	Asn
Aspartate	D	Asp
Cystéine	C	Cys
Glutamine	Q	Gln
Glutamate	E	Glu
Glycine	G	Gly
Histidine	H	His
Isoleucine	I	Ile
Leucine	L	Leu
Lysine	K	Lys
Méthionine	M	Met
Phénylalanine	F	Phe
Proline	P	Pro
Sérine	S	Ser
Thréonine	T	Thr
Tryptophane	W	Trp
Tyrosine	Y	Tyr
Valine	V	Val

Liste des figures

Figure 1: Cellule et gradient électrochimique.....	2
Figure 2: Diversité des canaux potassiques.	3
Figure 3: Structure des canaux potassiques.....	5
Figure 4: Différentes représentations du filtre de sélectivité.....	6
Figure 5: Architecture et mécanisme des canaux potassiques dépendants du voltage.....	7
Figure 6: Différents courants potassiques dépendants du voltage.	8
Figure 7: Le courant KCNQ1 est modulé par KCNE1.	10
Figure 8: Les K_{Vs} hétéromérisent avec les K_{V2} et modifient leurs propriétés biophysiques.. ..	11
Figure 9: Structure des canaux Slo.	12
Figure 10: Comparaison des courbes d'intensité de courant en fonction du voltage.....	14
Figure 11: Représentation du blocage des canaux K_{IR} par l'ion magnésium..	14
Figure 12: Activation des canaux GIRK par les récepteurs couplés aux protéines G.....	16
Figure 13: Implication des K_{ATP} dans le contrôle de la sécrétion d'insuline.....	17
Figure 14: Les courants potassiques de fond décrits par l'équation de GHK..	19
Figure 15: Courant unitaire TASK1 obtenu à partir d'enregistrements en configuration "outside-out" de cardiomyocytes ventriculaires de rat et en condition de symétrie de potassium.	21
Figure 16: Dépendance du courant TREK-1 en fonction du temps et du voltage.	21
Figure 17: Diversité des canaux potassiques à deux domaines pore.	22
Figure 18: TWIK1: un K_{2P} présent au niveau des endosomes de recyclage et pouvant changer de sélectivité en fonction du pH..	24
Figure 19: Régulation des canaux TASK.	26
Figure 20: Implication de TASK2 dans le transport de bicarbonate au niveau des cellules rénales.	30
Figure 21: Régulation de THIK-1 par l'acide arachidonique et l'halothane..	31
Figure 22: Régulation de TRESK par la calcineurine et la protéine 14-3-3.....	32
Figure 23: Localisation de TREK-1 et TREK-2 dans le cerveau de souris adultes..	37
Figure 24: TREK-1 est responsable du courant inconnu activé par le baclofène dans les souris GIRK2/3 KO.	39
Figure 25: Schéma de l'implication de TREK-1 dans la réponse aux antidépresseurs.....	41
Figure 26: Les souris TREK-1 ^{-/-} sont moins sensibles à l'halothane.....	42
Figure 27: Schéma représentant le mécanisme d'action de la mécano-sensibilité de TREK-1 et TRAAK.	47
Figure 28: TREK-1 est sensible à la température.	47
Figure 29: Modèle d'activation de TREK-1 par la température..	48
Figure 30: Mécanisme de régulation de TREK-1 et TREK-2 par le pH extracellulaire.....	50
Figure 31: Les canaux TREK-1 sont activés par les lipides.....	51
Figure 32: Régulation de TREK-1 et TREK-2 par le PIP ₂	52

Figure 33: Régulation de TREK-1 par les récepteurs couplés aux protéines G.	53
Figure 34: Régulation de TREK-1 par l'AKAP150.	54
Figure 35: MAP2 permet d'augmenter la densité de canaux TREK-1 à la membrane en s'associant à lui au niveau de son domaine C-terminal.	54
Figure 36: Expression de TRAAK.....	57
Figure 37: Les souris TRAAK ^{-/-} sont plus sensibles aux stimuli mécaniques et thermiques.....	58
Figure 38: Structure des K _{2p}	63
Figure 39: Représentation cristallographique de la fenêtre latérale du canal TRAAK.	64
Figure 40: Modèle de la régulation de TREK-1 par la PLD2..	76
Figure 41: Schéma du principe du SiMPull de TREK-1 avec une autre sous-unité de K _{2p}	79
Figure 42: Schéma de la Colocalisation à l'échelle de la molécule unique par fluorescence..	79
Figure 43: Effet de la mycolactone (Myco) sur le canal TRAAK en présence d'AT2R.	105
Figure 44: Réversibilité de l'action de la mycolactone.....	106
Figure 45: L'angiotensine II n'a pas d'effet sur TRAAK en présence ou absence d'AT2R.	107
Figure 46: L'angiotensine II n'est pas capable de reverser les effets de la mycolactone.	108
Figure 47: Le C21 inhibe le courant TRAAK en présence d'AT2R et ou de mycolactone.....	109
Figure 48: L'EMA401 n'est pas capable de reverser les effets de la mycolactone.	110
Figure 49: La mycolactone n'est pas capable de potentialiser le courant TRAAK en présence d'AT1R..	111
Figure 50: L'effet de la mycolactone sur TRAAK en présence d'AT2R est indépendante des protéines G α i.....	112
Figure 51: TREK-1 n'est pas modulé par la mycolactone en présence d'AT2R.....	112
Figure 52: La voie de signalisation induite par la mycolactone est restreinte spatialement	113
Figure 53: Le canal TRAAK co-immunoprécipite avec le récepteur AT2R-SNAP.....	114
Figure 54: Le domaine C-terminal de TRAAK est impliqué dans la régulation du canal par la mycolactone via AT2R..	115
Figure 55 : Le domaine C-terminal d'AT2R est impliqué dans la régulation de TRAAK par la mycolactone.	116
Figure 56: Schéma du circuit de la récompense.	119

Liste des Equations

Équation 1: Equation de Nernst	2
Équation 2: Equation de GHK.....	19

Avant-propos

Les cellules constituant tout organisme sont délimitées par une bicouche lipidique appelée membrane plasmique. Celle-ci isole l'intérieur de la cellule du milieu extracellulaire, cependant pour pouvoir survivre les cellules doivent pouvoir échanger avec l'extérieur. Cela est possible grâce à plusieurs familles de protéines. Chacune est spécialisée pour permettre le transport actif ou passif à travers la membrane d'un ou plusieurs types de molécules/d'ions.

Les canaux ioniques sont spécialisés dans le transport passif des ions à travers la membrane plasmique. Cette fonction simple les place au centre de très nombreux mécanismes biologiques cela à tous les niveaux de complexités. Dans la cellule ils permettent de faire le lien entre les différents compartiments. Au niveau de l'organisme entier, ils permettent la communication entre les cellules ainsi qu'avec le milieu extracellulaire. Ils jouent également le rôle d'intermédiaire entre le monde extérieur et l'organisme en permettant de traduire des *stimuli* physiques tel qu'un flux de photons ou une augmentation de température.

La place centrale des canaux ioniques à l'interface biologie-physique attira l'attention de physiciens. C'est ainsi que dans la première moitié du XX^{ème} siècle Hodgkin et Huxley posèrent les bases de l'électrophysiologie favorisant l'émergence de nouveaux concepts tels que le pore, le canal ionique, le « *gating* » ou encore la perméation. C'est aux cours des années soixante-dix que le canal ionique acquiert progressivement une "matérialité". Il devient une entité moléculaire, caractérisée par ses aptitudes à lier spécifiquement certains agents comme la tétródotoxine (TTX) et le tétraéthylammonium (TEA). Neher et Sackman, en inventant la technique du patch clamp, vont permettre la réalisation de mesures suffisamment fines pour pouvoir caractériser les canaux ioniques naturellement localisés dans les membranes plasmiques à l'échelle unitaire. Avec le temps la technique du patch clamp s'est étendue à de nombreux laboratoires avec des objectifs très divers. En faisant varier les conditions expérimentales (microenvironnement, condition de stimulation chimique et d'application du potentiel) de très nombreux canaux ioniques (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) ont été caractérisés par leurs propriétés biophysiques, et ce, chez tous les organismes vivants (procaryotes et eucaryotes du règne animal ou végétal).

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de déterminer les caractéristiques moléculaires des canaux ioniques. Grâce à des techniques comme la mutation ponctuelle et l'utilisation de systèmes d'expression hétérologue, l'étude d'une population de canaux ainsi que la caractérisation de leur structure ont été permises. Ainsi, la séquence protéique du canal a pris toute son importance, celle-ci déterminant la sélectivité ionique, la sensibilité aux activateurs/inhibiteurs ou encore les propriétés d'activation et d'inactivation.

C'est le gradient électrochimique qui permet de donner l'énergie nécessaire à un ion pour traverser la membrane *via* un canal ionique. Celui-ci est présent lorsqu'il y a une différence

de concentration en ions ainsi qu'une différence de charge de part et d'autre d'une membrane semi-perméable. C'est entre autre le cas au niveau de la membrane plasmique d'une cellule vivante. Au repos, cette différence est entretenue par des transporteurs ioniques qui permettent le transport actif des ions contre leur gradient de concentration à travers la membrane. La plus connue est la pompe Na^+/K^+ ATPase qui utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour importer des ions potassiques et exporter des ions sodium. Cela permet d'entretenir pour chacun de ces ions un gradient de concentration. De plus, il existe une différence de charges entre le milieu extra- et intracellulaire. Celle-ci est due au transport non symétrique du sodium et du potassium par la Na^+/K^+ ATPase. En effet, pour 3 ions Na^+ exportés seulement 2 ions K^+ sont importés. L'intérieur des cellules est donc riche en potassium et chargé négativement alors que l'extérieur de la cellule est riche en sodium et chargé positivement (Figure 1).

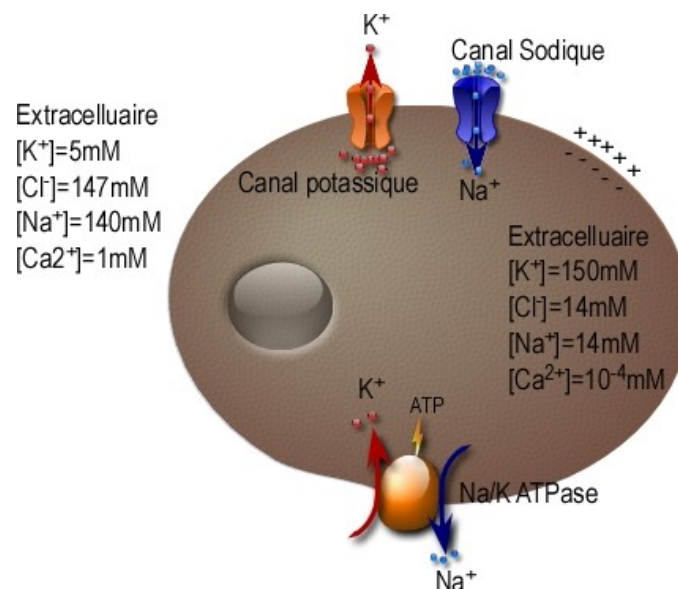


Figure 1: Cellule et gradient électrochimique. Au repos la concentration des différents ions n'est pas la même de part et d'autre de la membrane plasmique. Pour le potassium et le sodium cette différence est entretenue par la pompe Na^+/K^+ ATPase. Les canaux permettent le passage passif des ions à travers la membrane suivant le gradient électrochimique.

Le potentiel de membrane résulte de la combinaison des différents flux ioniques générés par leurs gradients de concentration et leurs gradients électriques. La différence de potentiel entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule au repos est mise en évidence pour chaque ion grâce à l'équation de Nernst:

$$E_{ion} = \frac{R * T}{z * F} * \text{Ln} \frac{[ion]_{ext}}{[ion]_{int}}$$

Équation 1: Equation de Nernst. R est la constante des gaz parfaits, égale à $8,3144621 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$. T la température absolue en kelvin. F est la constante de Faraday, égale à $96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1} = 1 \text{ F}$. z la charge de l'ion perméant (avec le signe).

Il est apparu que le potentiel repos mesuré dans la plupart des cellules est proche du potentiel d'équilibre de l'ion potassium. Cela est dû au fait qu'au repos la membrane

plasmique est surtout perméable aux ions potassium permettant ainsi une sortie constante de K^+ . Ainsi, c'est la fuite d'ions potassium ainsi que l'action de la Na^+/K^+ ATPase qui permettent de maintenir le potentiel de membrane à des valeurs constantes.

Aujourd'hui 80 gènes ont été identifiés chez les mammifères codant pour des canaux potassiques, c'est de loin la famille de canaux la plus diversifiée (Figure 2). Ils sont impliqués dans quasiment toutes les fonctions physiologiques et leurs dysfonctionnements sont observés dans diverses maladies génétiques et auto-immunes. Ils sont également impliqués dans certains cancers.

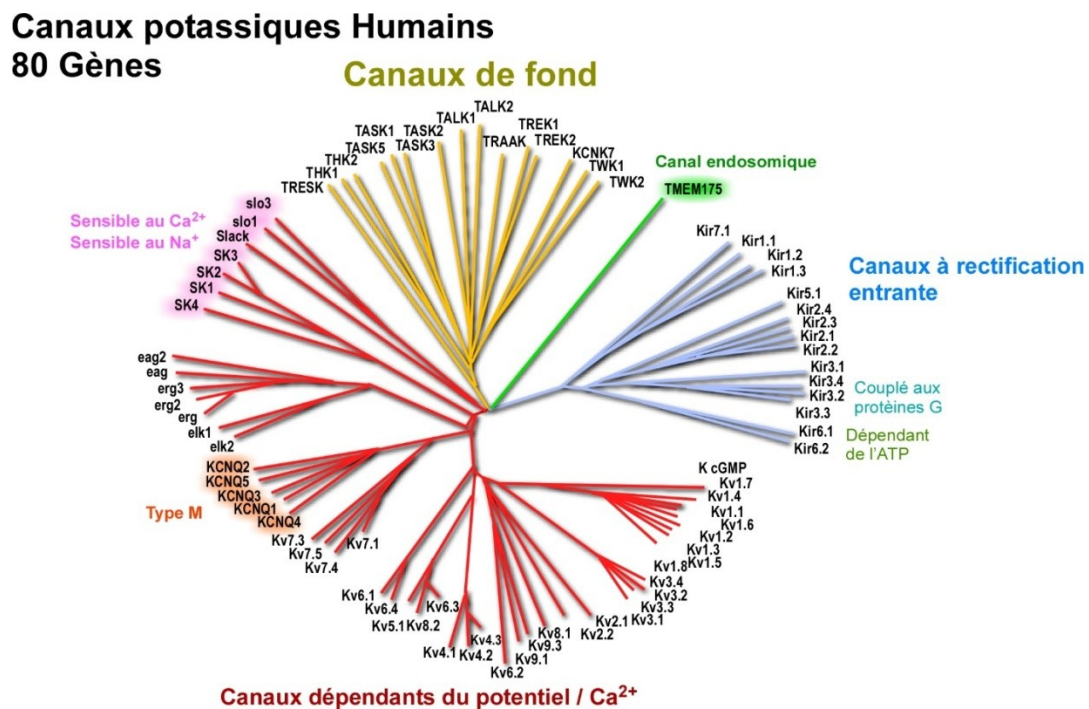


Figure 2: Diversité des canaux potassiques. Arbre phylogénétique des différentes sous-unités des canaux potassiques. Les 80 gènes sont regroupés en 3 grands groupes. Les canaux dépendants du potentiel ou Kv (rouge). Les canaux à rectification entrante Kir (bleu). Les canaux de fond ou à deux domaines pores K_{2P} (jaune). Le canal TMEM175, caractérisé récemment, est à part; celui-ci possédant une architecture totalement différente des autres canaux potassiques.

Lors de ma thèse, je me suis intéressé à la famille des canaux potassiques à deux domaines pores et plus spécifiquement à la sous-famille TREK. J'ai pu étudier divers mécanismes de régulation de ces canaux par les phospholipides et protéines partenaires, ainsi que leur hétéromérisation. La première partie du mémoire abordera la diversité des canaux potassiques ainsi que leurs caractéristiques générales. Ensuite, les canaux potassiques à deux domaines pores seront extensivement décrits notamment la sous-famille TREK. J'aborderai leurs caractéristiques générales, leurs implications physiologiques et leurs modes de régulation. Enfin je décrirai la structure de ces canaux ainsi que leur capacité à hétéromériser.

I-Introduction

I.1 La grande famille des canaux potassiques

Comportant 80 membres, il s'agit d'une des plus grandes familles de protéines (Figure 2). Cette remarquable diversité est encore augmentée par l'épissage alternatif et leur capacité à réaliser des hétéromères. Cette variabilité moléculaire reflète leur diversité fonctionnelle leur permettant d'être impliqués dans un grand nombre de fonction physiologiques et dans plusieurs pathologies. Ce premier chapitre s'intéresse aux différentes familles de canaux potassiques. Nous verrons leur structure commune puis, famille par famille, leurs caractéristiques et leurs rôles physiologiques.

I.1.1 Structure générale

Bien qu'il y ait de grandes différences au niveau de leur structure primaire, les canaux potassiques partagent des caractéristiques communes. Il est plus que probable que ces canaux soient apparus avec les premières formes de vie sur terre, comme peuvent l'attester les 200 canaux découverts chez les bactéries et les *archaea*. L'identification de canaux potassiques chez la bactérie (Schrempf et al., 1995) a permis de rendre réalisable le rêve de nombreux biologistes: avoir une quantité de protéines assez importante pour produire un cristal pouvant être analysé par rayons X. Le groupe de MacKinnon fut le premier à obtenir une structure cristallographique du canal potassique KcsA provenant de la bactérie *Streptomyces lividans* (Doyle et al., 1998). Cela permet de confirmer les résultats d'études structure fonction ayant caractérisé les modes d'ouverture et de fermeture de ces canaux ainsi que leur sélectivité (Heginbotham et al., 1994; Neyton and Miller, 1988).

Pour être fonctionnel les canaux potassiques doivent s'associer en complexe protéique de 4 ou 2 sous-unités dites α qui forment le pore du canal. Ce complexe peut être formé de sous-unités de même nature, on parle alors d'homomère, ou de nature différente, on parlera alors d'hétéromère. Enfin on peut noter que des sous-unités auxiliaires, aussi appelées sous unité β , peuvent venir compléter le canal et changer ces propriétés biophysiques.

Quasiment toutes les sous-unités α des canaux potassiques possèdent une structure particulière appelée "boucle P". Celle-ci est extrêmement conservée entre les différentes espèces et est essentielle à la formation du filtre de sélectivité des canaux potassiques. Quatre boucles P sont nécessaires pour constituer un filtre fonctionnel.

On peut tout de même noter que le dernier canal potassique cloné récemment, TMEM175, ne possède pas cette séquence (Cang et al., 2015).

Les domaines intra- et extracellulaire peuvent être de taille très variable. Ils possèdent de nombreux sites de régulation permettant d'influencer l'ouverture, la fermeture ou la conductance du canal (González et al., 2012).

Les canaux potassiques sont regroupés en 3 grands groupes en fonction de leur structure et de leurs propriétés (Figure 3) : les canaux à 6/7 domaines transmembranaires avec une boucle P, les canaux à 2 domaines transmembranaires et 1 domaine P et les canaux à 4 domaines transmembranaires et 2 domaines P. TMEM175 quant à lui possède 2 fois 6 domaines transmembranaire et pas de boucle P.

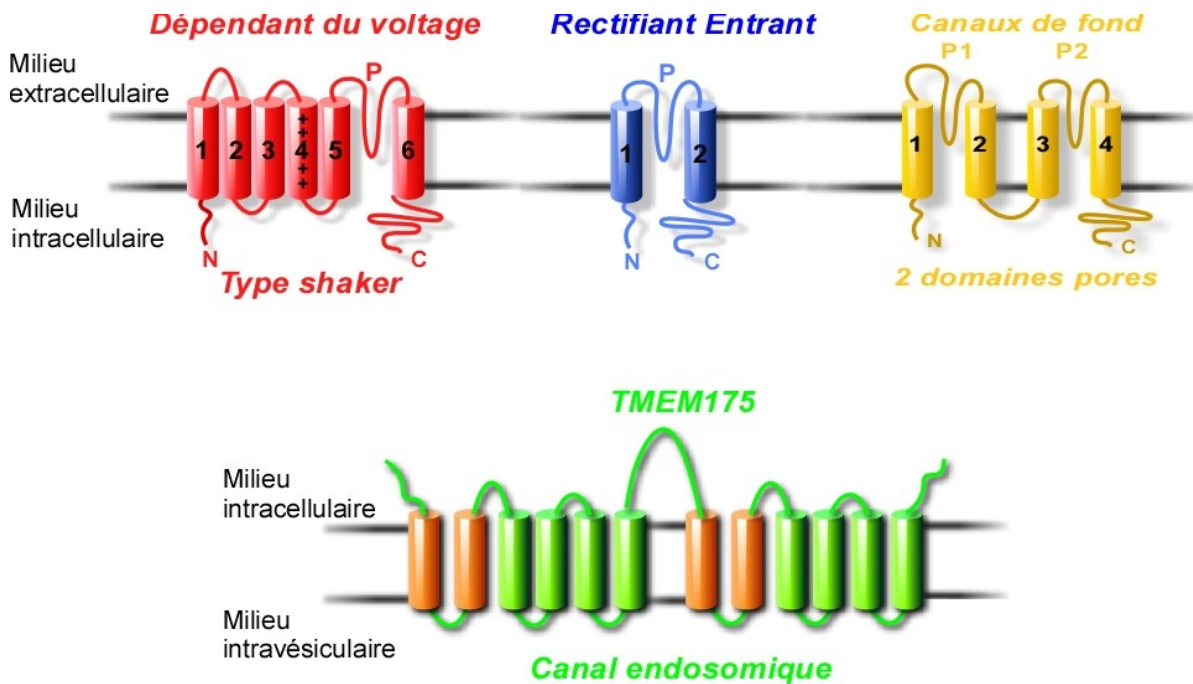


Figure 3: Structure des canaux potassiques. Les canaux dépendants du voltage (rouge) possèdent 6 domaines transmembranaires et un domaine pore. Le domaine sensible au voltage est porté par le segment 4. Les canaux à rectification entrante (bleu) possèdent deux segments transmembranaires et un domaine pore. Les canaux de fond (jaune) possèdent quatre segments transmembranaires et deux domaines pores. TMEM175 possède six segments transmembranaires répétés deux fois. Le pore serait porté par le segment 1.

I.1.2 La boucle P: Filtre de sélectivité au K^+

Le domaine pore ou boucle P partage le même mécanisme de transport des ions que la boucle P des canaux Na^+ et Ca^{2+} , c'est-à-dire permettre aux ions de passer sur une simple file. Le pore des canaux potassiques forme un chemin énergétiquement favorable à la conduction des ions K^+ . Cela signifie qu'il est très sélectif (efficacité de 1000 pour 1) et permet un flux d'ions rapide compris en 10^6 et 10^8 ions/s dans des conditions physiologiques. Malgré le fait que les canaux potassiques soient la famille la plus diversifiée la séquence du pore reste très conservée; on peut même parler de séquence signature des canaux potassiques TxGYG (Heginbotham et al., 1994). A partir de cette séquence, d'autres canaux potassiques ont pu être clonés dont les K_{2P} . On peut tout de même noter que chez certains canaux, dont les K_{2P} la tyrosine peut être remplacée par une phénylalanine voire une leucine (exemple: le P2 de TWIK1 (Lesage et al., 1996a)) dans de rares cas. On peut donc écrire la séquence du filtre de la manière suivante G[Y/F/L]G (Shealy et al., 2003).

1.1.2.1 Structure et site de fixation

La structure du KcsA a permis une meilleure compréhension du filtre de sélectivité des canaux potassiques (Doyle et al., 1998). La séquence signature du filtre de sélectivité forme une boucle qui projette au centre du canal (Figure 4A). L'assemblage des 4 boucles dans le complexe tétramérique forme un couloir de 12 Å de long (Figure 4C). Les oxygènes des groupements carbonyles permettent de former 5 anneaux qui sont autant de sites de fixation pour le potassium. Une résolution plus précise du canal a pu mettre en évidence que les sites de fixation du potassium se trouvent entre deux anneaux d'oxygènes. On en dénombre quatre: S1, S2, S3 et S4 (Figure 4B). Les atomes K^+ positionnés dans de tels sites sont coordonnés par 8 atomes d'oxygène (Alam and Jiang, 2011; Zhou et al., 2001).

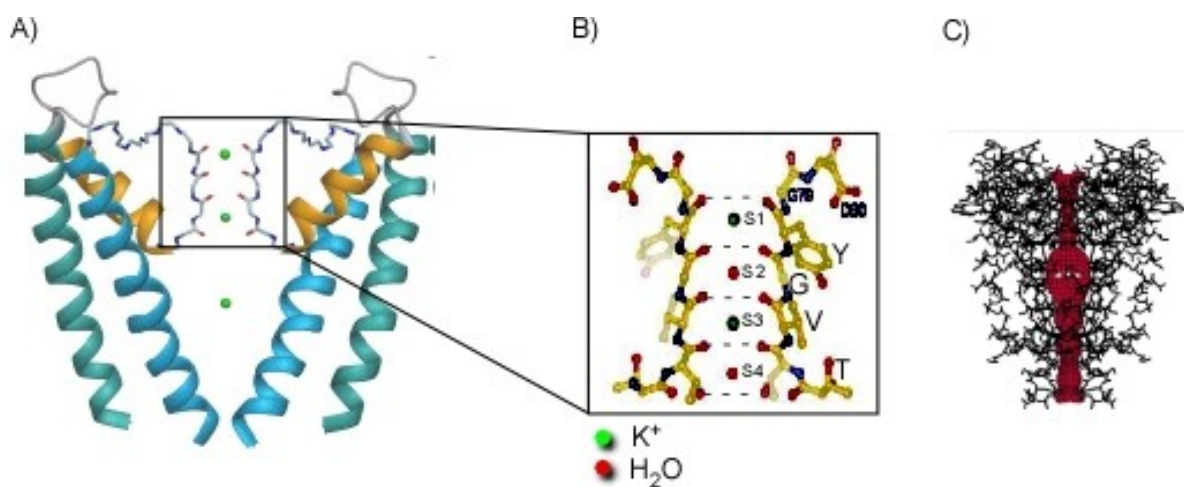


Figure 4: Différentes représentations du filtre de sélectivité. (A) Structure schématique de deux des quatre sous-unités du canal potassique KcsA, les ions potassium sont représentés en vert. Modifié d'après Noskov and Roux, 2006 (B) Structure du filtre de sélectivité de KcsA. Les atomes d'oxygène des groupements carbonyles des acides aminés TVGYG ainsi que l'oxygène du groupement hydroxyle de la première thréonine forment cinq anneaux délimitant les quatre sites de fixation des ions K^+ numérotés de S1 à S4. Les ions K^+ sont représentés par des sphères vertes. Modifié d'après Zhou et al. 2001 (C) Vue du pore interne du canal potassique KcsA. Dans la représentation en bâton (noir) de la structure 3D du canal est indiquée en rouge la distance minimale entre le centre radial du pore du canal et le plus proche contact avec la protéine. D'après Doyle et al. 1998.

1.1.2.2 Conductance

Le filtre possède deux états d'occupation des sites de fixation du potassium. En effet, les quatre sites ne seraient pas tous occupés par du K^+ en même temps mais il y aurait une alternance entre une molécule d'eau et un ion K^+ . Ainsi, deux configurations sont possibles: la configuration 1,3 (S1/ K^+ , S2/ H_2O , S3/ K^+ , S4/ H_2O) et la configuration 2,4 (S1/ H_2O , S2/ K^+ , S3/ H_2O , S4/ K^+). Le mécanisme de conduction proposé consiste en un échange concerté entre les deux configurations 1,3 et 2,4 jusqu'à l'arrivée d'un troisième ion d'un côté du filtre. Cela provoque la sortie d'un K^+ de l'autre côté. La structure du filtre de sélectivité permet de minimiser l'énergie nécessaire au transfert entre ces deux configurations et de maximiser la vitesse de conduction ionique (Bernèche and Roux, 2001; Morais-Cabral et al., 2001).

I.1.3 Les grandes familles de canaux K^+

I.1.3.1 Canaux à 6/7 domaines transmembranaires

I.1.3.1.1 Les K_v :

I.1.3.1.1.a Structure et caractéristiques générales

Ils sont composés de 6 domaines transmembranaires et d'une boucle P. Ils doivent donc former des tétramères pour être fonctionnels. Les segments transmembranaires de tous les K_v montrent des similarités incluant un domaine sensible au voltage (voltage-sensitive domain : VSD) compris entre les segments S1 à S4, le segment 4 étant le senseur (Aggarwal and MacKinnon, 1996; Seoh et al., 1996). Le domaine pore quant à lui est compris entre les segments S5 et S6. (Figure 5A)

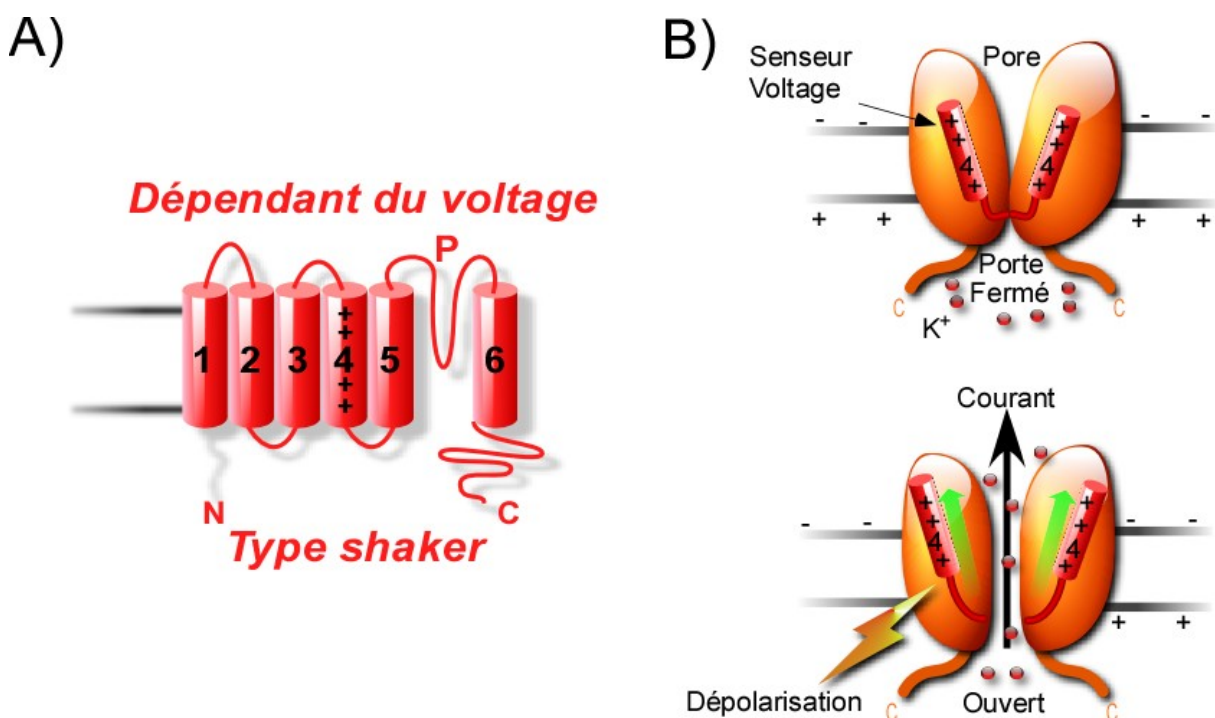


Figure 5: Architecture et mécanisme des canaux potassiques dépendants du voltage. (A) Les K_v possèdent 6 domaines transmembranaires et une boucle P, le senseur du voltage est porté par le segment 4. (B) Mécanisme d'action de la sensibilité au voltage des K_v . Une dépolarisation induit un changement de conformation du segment 4 entraînant l'ouverture du pore.

Le contrôle de ces canaux par le voltage est conféré par la liaison entre le VSD et le pore du canal. La fonction primaire de ce domaine est d'exercer une action mécanique qui va modifier la conductance du pore (Figure 5B). Cela va permettre d'ouvrir et de fermer ce dernier. Ce sont les charges positives contenues dans le segment S4 qui vont permettre la transformation de l'énergie électrique en énergie mécanique (Aggarwal and MacKinnon, 1996).

Ces canaux sont inactifs au potentiel de repos et ne s'ouvrent que lors d'une dépolarisation dépassant leur seuil d'activation. La sortie massive de K^+ qui en résulte permet la

repolarisation de la membrane et le retour au potentiel de repos de la cellule. Il existe plusieurs types de courant induit par les K_v (Figure 6).

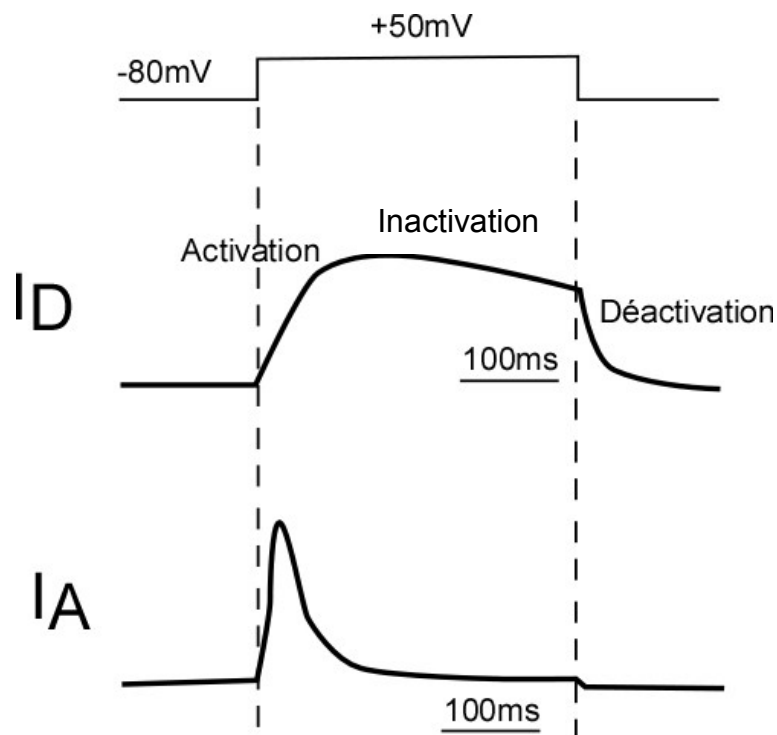


Figure 6: Différents courants potassiques dépendants du voltage. Enregistrement électrophysiologique des courants potassiques en condition physiologique de potassium. Les cinétiques d'activation, d'inhibition et de déactivation permettent de différencier les courants de type A et de type D.

Courant Transitoire ou de type-A (I_A) : Ces courants se caractérisent par une activation et une inactivation très rapide permettant de donner une réponse transitoire (Figure 6). Ils jouent un rôle clef dans la modulation de l'intervalle des potentiels d'action. Lorsque le potentiel de membrane atteint une valeur de l'ordre de -50 mV il y a déclenchement de ce courant. Ils ne peuvent être réactivés que si la membrane retrouve une polarisation inférieure à -50 mV (Gola and Romey, 1971).

Les courants potassiques à rectification retardée (I_D) : Ce nom a été utilisé pour la première fois par Hodgkin et Huxley pour décrire le courant K^+ principal de l'axone de calamar. Celui-ci apparaissant après le courant dépolarisant Na^+ lors du potentiel d'action (Hodgkin and Huxley, 1952a). Ces courants participent ainsi à la repolarisation du potentiel d'action, à la période réfractaire et au contrôle de la fréquence d'excitabilité (Figure 6).

1.1.3.1.1.b Les différentes sous familles

Les différents séquençages ont permis de diviser cette famille en 4 catégories en fonction de leur homologie de séquence :

Les shakers ou $K_v1.X$ (1 à 8):

On les retrouve dans tout le cerveau mais aussi dans le cœur, le muscle squelettique la rétine et le pancréas (Browne et al., 1994; Gutman et al., 2005; Scheffer et al., 1998). Les $K_v1.X$ sont sensibles au 4-AP (Grissmer et al., 1994) ainsi qu'à plusieurs toxines et composés suivant le type de sous-unité. Par exemple $K_v1.2$ et $K_v1.3$ sont sensibles à la charybdotoxine et la noxiustoxine. $K_v1.4$ est sensible au riluzole, quinidine et nicardipine. Enfin $K_v1.1$ et $K_v1.6$ peuvent être inhibés par une toxine d'anémone la Stichodactyla toxin (Chandy et al., 2001; Kalman et al., 1998).

Les Shab ou $K_v2.X$ (1 et 2), les Shaw ou $K_v3.X$ (1 à 4) et les Shal ou $K_v4.X$ (1 à 3) :

Ils sont exprimés dans le cerveau, le muscle lisse, les poumons, le cœur, les testicules et le pancréas (Gutman et al., 2005). Ils peuvent générer des courants retardés I_D (ex : $K_v2.X$) ou des courants transitoires I_A (ex : $K_v3.3$). Ils sont inhibés par le TEA (Tétraéthylammonium) et par le 4-AP (4-aminopyridine).

La famille des KCNQ ou $K_v7.X$ (1 à 5):

On les retrouve dans le cœur, le cerveau, le pancréas, la thyroïde, l'oreille interne, l'estomac, les muscles et les intestins. Ils y jouent un rôle important dans la dépolarisation des membranes et dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire. De nombreuses mutations sur les canaux de cette famille ont été décrites dans des maladies génétiques comme par exemple dans l'arythmie cardiaque, le diabète, la surdité congénitale ou encore l'épilepsie (Maljevic et al., 2010).

Les courants natifs induits par KCNQ1 ($K_v7.1$) sont régulés par leur association avec une protéine auxiliaire β , KCNE1 (K⁺ voltage-gated channel subfamily member E1). Des mutations associées soit à KCNQ1 soit à KCNE1 qui dans les deux cas modifie le courant potassique (Figure 7) ont été rapportées dans le syndrome cardiaque du QT long de type 1 et de surdité (Schulze-Bahr et al., 1997; Splawski et al., 1997).

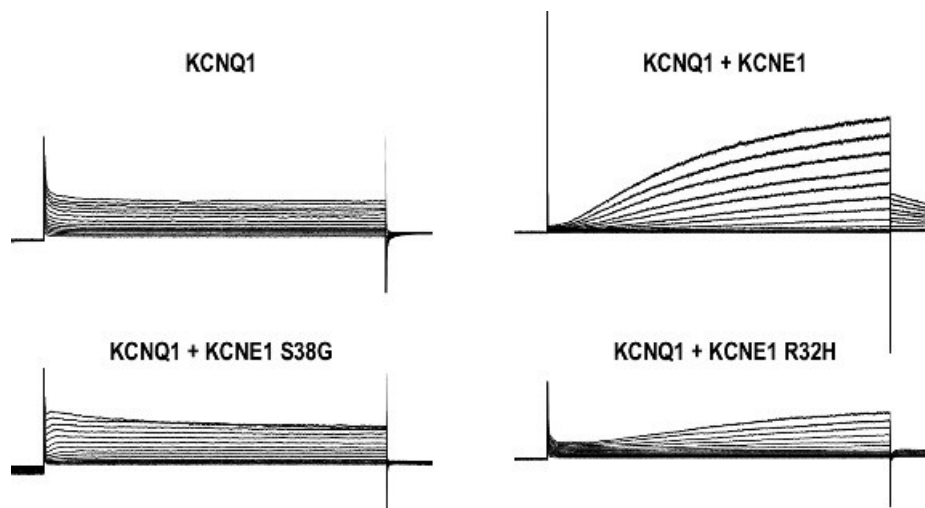


Figure 7: Le courant KCNQ1 est modulé par KCNE1. On remarque que la présence de KCNE1 change la cinétique de KCNQ1. Certains mutants de KCNE1 perdent l'habilité à moduler le courant KCNQ1; cette caractéristique les implique dans le syndrome du QT long.

Cette maladie se caractérise par un allongement de l'intervalle QT de l'électrocardiogramme induisant un risque élevé de torsade de pointe ou de fibrillation ventriculaire.

La famille des Ether-a-gogo (Eag)

Cette famille a tout d'abord été découverte chez la drosophile sous le nom d'éther-à-go-go. Chez l'humain le nom du gène de cette famille est KCNH. Celle-ci est constituée de 3 sous-familles : Les K_v10 , K_v11 et K_v12 . Ils produisent un courant avec une activation lente et qui s'inactive très peu. Ils participent à la repolarisation du potentiel d'action dans le cœur et le cerveau.

hERG1 ($K_v11.1$) joue un rôle crucial dans le cœur où il génère des courants lentement activés et rapidement inactivés. Des mutations de ce canal induisent le syndrome du QT long de type 2 (Shoeb et al., 2003; Splawski et al., 2000) en augmentant la durée du potentiel d'action ventriculaire.

La famille des « Modifiers/Silencers » ou K_vS

On compte dans cette famille 4 sous-groupes : $K_v5.1$, $K_v6.X$ (1 à 6), $K_v8.X$ (1 et 2) et $K_v9.X$ (1 à 9). Ces canaux ne sont pas fonctionnels à l'état d'homotétramère (Gutman et al., 2005). Ils ne peuvent former un canal qu'en s'associant au $K_v2.X$ et permettent de moduler leur cinétique d'activation et d'inactivation (Figure 8). Les K_vS ont trois caractéristiques en commun. Tout d'abord, ils ont la même structure que les autres K_v (6 domaines transmembranaires, un segment S4 chargé et une séquence GYG au niveau du pore) mais ils ne peuvent pas former de canaux fonctionnels homomériques car ils sont retenus dans le réticulum endoplasmique. Les K_vS hétéromérisent avec les K_v2 mais pas avec K_v1 , K_v3 et K_v4 et en modulent leurs propriétés biophysiques. Par exemple, $K_v6.1$ déplace la voltage-dépendance de $K_v2.1$ d'environ 50mV vers des valeurs de potentiel plus hyperpolarisées, en

facilitant la déphosphorylation calmoduline dépendante de $K_v2.1$ (Kramer et al., 1998; Salinas et al., 1997).

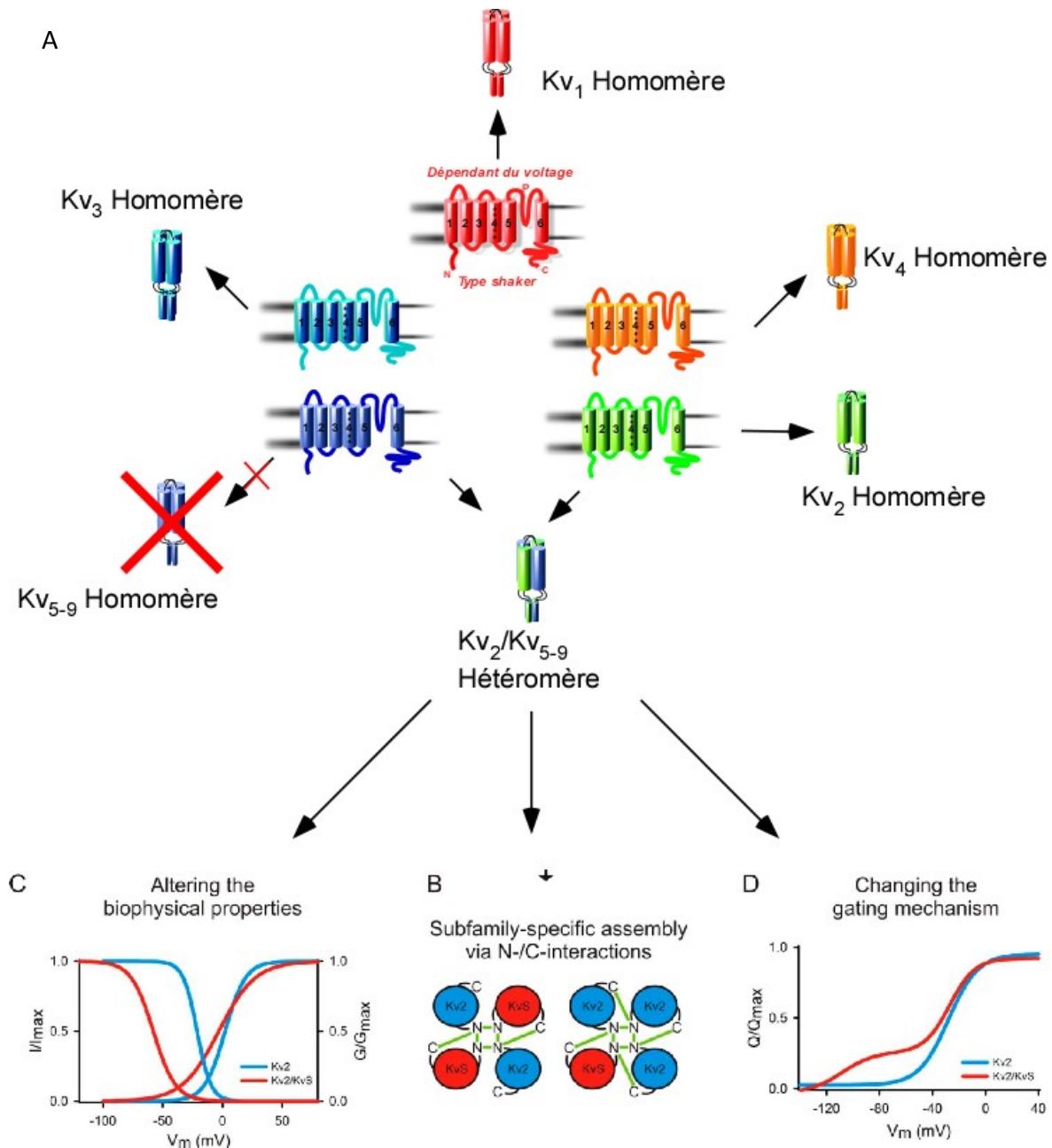


Figure 8: Les K_vS hétéromérisent avec les K_v2 et modifient leurs propriétés biophysiques. (A) Chaque sous-famille des canaux K_v est représentée par une couleur différente. Les membres des sous-familles K_v5 à 9 ne peuvent pas former d'homomères mais peuvent s'assembler avec les membres de la famille K_v2 . (B) L'association des sous-unités formant l'hétéromère se fait via des interactions (en vert) entre leur domaine N-terminal et C-terminal. (C) L'hétéromérisation K_v2/K_vS peut induire un déplacement dans la dépendance au voltage de l'activation ou l'inactivation des K_v2 . (D) Certaines sous-unités K_vS peuvent moduler les propriétés biophysiques des K_v2 en modifiant leur mécanisme de "Gating". Modifié à partir de Bocksteins, 2016.

Alors que $K_v 2.1$ est exprimé de manière ubiquitaire, les K_vS montrent une expression plus restreinte laissant suggérer que les hétéromères K_v2/K_vS ont une fonction tissu-spécifique.

1.1.3.1.2 Les K_{Ca} , Slo ou "Big" potassium (BK) channels.

Cette famille est encodée par les gènes *Slo*, ils sont entre autres caractérisés par leur très grande conductance (Salkoff et al., 2006) d'où leur nom « Big » K. À certains égards, la famille des canaux *Slo* est similaire aux canaux classiques avec un courant potassique à rectification retardée. Cependant, ils sont plus polyvalents: leur gamme de sensibilité au voltage peut être modifiée par des facteurs incluant le Ca^{2+} , le Na^+ , le Cl^- , le pH et la phosphorylation. La famille des *Slo* comporte 4 membres *Slo1*, deux paralogues de *Slo2* (*Slo2.1* ou *Slick* et *Slo2.2* ou *Slack*) et *Slo3*. Ces 4 gènes encodent pour des sous-unités α pouvant former des homotétramères.

1.1.3.1.2.a Structure

Leur structure ressemble aux canaux K^+ voltage-dépendant (Figure 9). Cependant *Slo1* et 3 possèdent un septième segment transmembranaire (M0). Leur plus grande différence réside dans leur domaine C-terminal. En effet, celui-ci est particulièrement long et possède des domaines hydrophobes et hydrophiles. C'est cette partie qui confère aux canaux leurs différentes propriétés.

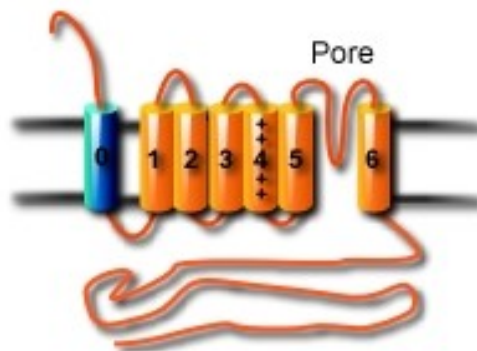


Figure 9: Structure des canaux *Slo*. Les sous-unités *Slo* possèdent un septième segment transmembranaire (M0 en bleu) ainsi qu'un important domaine C-terminal. Celui-ci est impliqué dans la plupart des régulations de ces canaux.

1.1.3.1.2.b *Slo1*

Ils sont exprimés entre autres dans le système nerveux central, le pancréas et les muscles lisses. Ils peuvent être régulés par le voltage seul, le calcium seul ou de manière synergique par la dépolarisation et le Ca^{2+} (Meera et al., 1997).

La sensibilité de *Slo1* pour le Ca^{2+} fait de lui un important acteur dans le rétrocontrôle négatif de l'entrée du calcium dans les cellules. Dans le système nerveux central (SNC), il joue un rôle important dans la sécrétion des neurotransmetteurs (Robitaille and Charlton, 1992). Il permet aussi la repolarisation après un potentiel d'action (Hu et al., 2001) et est à l'origine de la phase rapide de l'hyperpolarisation ayant lieu après un potentiel d'action (Adams et al., 1982).

1.1.3.1.2.c *Slo2*

Chez les mammifères il existe deux *Slo2* paralogues *Slo2.1* et *Slo2.2*. Ils ont la particularité de pouvoir être activés par le sodium et le chlore. *Slo2.2* peut former des hétérotétramères

avec *Slo1*, permettant ainsi d'obtenir un canal avec de nouvelles propriétés biophysiques. Ces canaux ont un rôle dans l'adaptation du taux de décharge lors des trains de potentiels d'action (Bhattacharjee and Kaczmarek, 2005).

1.1.3.1.2.d Slo3

Le canal *Slo3* est uniquement exprimé dans les testicules et plus précisément pendant le développement des spermatoocytes ainsi que la maturation du sperme. Il joue un rôle important dans la capacitation du sperme, processus rendant ce dernier capable de fertiliser l'ovule (Schreiber et al., 1998). Contrairement aux autres *Slo*, *Slo3* est sensible au voltage et à l'alcalinisation intracellulaire. Cette sensibilité provient de sa partie C-terminale (Xia et al., 2004). Enfin, on peut noter qu'il est très sensible au Ba^{2+} , TEA, Ibériotoxine (IbTX) et Charybdotoxine (ChTx) (Tang et al., 2010).

*1.1.3.1.3 La famille des canaux à faible conductance K^+ (SK_{Ca} (*S pour Small*), K_{Ca2})*

Ces canaux ont été découverts dans les globules rouges, ils sont sensibles au calcium mais ont une conductance faible d'où leur nom « Small » K. Cette famille comporte 4 membres: 3 avec une faible conductance ($K_{Ca2.1}$, $K_{Ca2.2}$ et $K_{Ca2.3}$) et 1 avec une conductance intermédiaire ($K_{Ca3.1}$). Les canaux $K_{Ca2.1-3}$ sont surtout exprimés au niveau neuronal et sont sensibles à l'apamine. $K_{Ca3.1}$ quant à lui, est principalement exprimé dans des cellules non neuronales et n'est pas sensible à l'apamine (González et al., 2012).

1.1.3.1.3.a Structure et fonction

Les K_{Ca2} possèdent 6 domaines transmembranaires et une boucle P. Le segment 4 de ces canaux possède 2 arginines les rendant voltage-dépendant. Ils sont très sensibles au calcium avec une concentration inhibitrice médiane (IC_{50}) comprise entre 300 et 700nM et une activation très rapide (Xia et al., 1998). Ils possèdent une inactivation constante de l'ordre d'une dizaine de milliseconde, celle-ci étant responsable des changements sur le "long-terme" du potentiel de membrane. Par exemple ils sont impliqués dans les mAHP (medium afterhyperpolarization) des neurones du CA1 de l'hippocampe (Bond et al., 2004). L'afterhyperpolarization est l'un des principaux mécanismes de rétrocontrôle dans la modulation de la fréquence des potentiels d'actions. Cette repolarisation importante permet de donner la forme du potentiel d'action et de définir une période réfractaire durant laquelle le neurone ne peut plus produire décharger.

Leur sensibilité au calcium provient de leur interaction avec la calmoduline formant un complexe stable. C'est la liaison du Ca^{2+} sur cette protéine qui va induire l'ouverture du canal (Maylie et al., 2004).

Les SK_{Ca} sont impliqués dans des processus du système nerveux périphérique, comme le contrôle du tonus vasculaire (Taylor et al., 2003), la contraction utérine (Brown et al., 2007) ou le volume des globules rouges (Hoffman et al., 2003). Au niveau du système nerveux central ils sont impliqués dans l'apprentissage, la mémoire et la plasticité synaptique (Hammond et al., 2006).

1.1.3.2 Canaux à deux domaines transmembranaires: Les K_{ir}

En 1949, Bernard Katz note (Katz, 1949) dans le muscle la présence d'un courant potassium ayant un comportement atypique lorsqu'on le compare au courant rectifiant sortant présent dans l'axone de calamar. En effet, en fonction du gradient électrochimique le courant potassium est rectifiant entrant. Bien qu'ouvert à tous les potentiels de membranes, ces canaux ont une conductance qui augmente lors d'une hyperpolarisation. Celle-ci diminue lorsque la dépolarisation dépasse le potentiel d'équilibre de l'ion potassium (Figure 10).

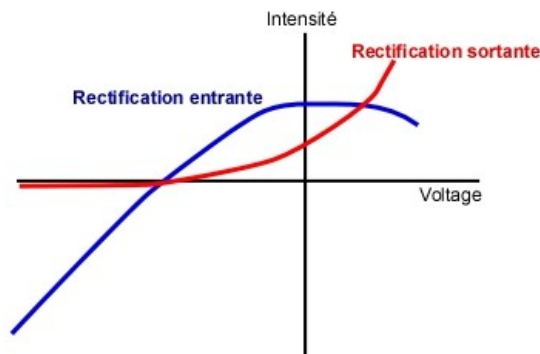


Figure 10: Comparaison des courbes d'intensité de courant en fonction du voltage. La rectification sortante se caractérise par une intensité de courant qui augmente avec les valeurs de potentiels dépolarisés (rouge). La rectification entrante se caractérise par une diminution du courant sortant avec les valeurs de potentiels dépolarisés (bleu).

Cette caractéristique est due au blocage du pore par un ion magnésium ou par des polyamines (Lopatin et al., 1994; Lu, 2004). L'ion Mg^{2+} vient boucher littéralement le pore du canal limitant la sortie du potassium mais n'empêchant pas son entrée (Figure 11).

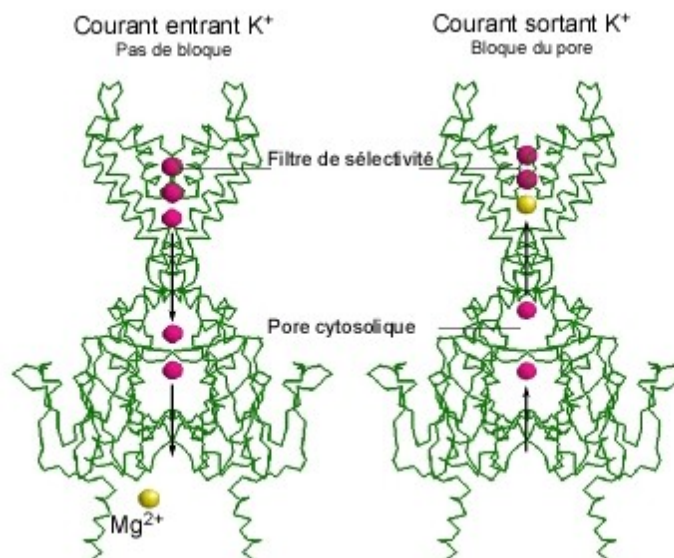


Figure 11: Représentation du blocage des canaux K_{ir} par l'ion magnésium. Lorsque le potentiel de membrane est inférieur au potentiel de réversion du potassium, les ions K^+ peuvent rentrer. Lorsque le potentiel de membrane dépasse le potentiel d'équilibre du potassium un ion magnésium vient bloquer le pore du canal, empêchant ainsi le courant sortant. Modifié à partir de Hsieh et al., 2015.

Tous les canaux K_{ir} ne présentent pas la même rectification, en effet, on peut trouver des canaux K_{ir} dits faibles et d'autres dits forts. Les canaux K_{ir} sont aussi modulés par des nucléotides comme l'adenosine-tri-phosphate (ATP) et l'adenosine-di-phosphate (ADP), la phosphorylation, les protéines G et le Phosphatidyl inositol diphosphate (PIP_2).

Les canaux K_{ir} sont bloqués par le Ba^{2+} et le Cs^+ , par contre les inhibiteurs classiques des canaux potassiques comme le TEA ou le 4-aminopyridine (4-AP) ont peu d'effets (Hibino et al., 2009). De plus, il est à noter que la sensibilité au Ba^{2+} dépend du type de canaux K_{ir} .

Les 7 sous-familles de K_{ir} peuvent être regroupées en 4 groupes fonctionnels.

1.1.3.2.1 Les K_{ir} dits Classiques ou $K_{ir}2.X$

Ces canaux montrent une grande rectification entrante, sont constitutivement activés et on les trouve surtout dans le tissu ventriculaire. Dans les myocytes cardiaques, l'hétéromère $K_{ir}2.1$ et $K_{ir}2.2$ (Zobel et al., 2003) est à l'origine du courant de fond I_{K1} et stabilise le potentiel de membrane à une valeur proche du potentiel de réversion du potassium (env. -90mV). Ce courant devient négligeable lorsque le voltage est supérieur à E_K . L'absence de courant I_{K1} à des potentiels dépolarisant permet de maintenir la dépolarisation donnant ainsi la forme de plateau du potentiel d'action cardiaque.

On retrouve aussi $K_{ir}2.2$ dans les cellules endothéliales et les cellules des muscles lisses. Il permet de maintenir le potentiel de membrane obligeant le Ca^{2+} à entrer dans la cellule. Cela permet l'activation de la machinerie moléculaire produisant le monoxyde d'azote (NO) qui est vasorelaxant (Cuiling Liu et al., 2006).

Tous les K_{ir} classiques sont exprimés dans le cerveau plus particulièrement aux niveaux des somas et dendrites des neurones. Ils y jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de repos et dans le contrôle de l'excitabilité cellulaire (Day et al., 2005).

Ils sont activés par le PIP_2 , un phospholipide ancré dans la membrane plasmique. L'interaction de $K_{ir}2.1$ avec PIP_2 semble être perturbée lors de l'inhibition de ces canaux par la phosphorylation (*via* la Protéine kinase C: PKC) ou par le pH intracellulaire (Henry et al., 1996; Karle et al., 2002; Qu et al., 2000).

Enfin dans les muscles squelettiques (Doupnik et al., 1995) ces canaux sont liés au syndrome d'Andersen où le canal est muté au niveau des régions situées sur les domaines cytoplasmiques proches des sites de fixation du PIP_2 (Donaldson et al., 2003; Plaster et al., 2001). Le syndrome d'Andersen est à l'origine de paralysies ou de faiblesses musculaires associées à une arythmie cardiaque.

1.1.3.2.2 Les canaux à rectification entrante activés par les protéines G (K_G) ou $K_{ir}3.X$

Ils sont aussi connus sous le nom de GIRK et comme leur nom l'indique, ils sont modulés par les protéines G. Il existe 4 membres de cette sous-famille allant de $K_{ir}3.1$ à $K_{ir}3.4$. Seul $K_{ir}3.2$ et $K_{ir}3.4$ sont capable de former des homotétramères. $K_{ir}3.1$ et $K_{ir}3.3$ quant à eux doivent

s'associer à une autre sous-unité et former les hétéromères suivant: $K_{ir}3.1/K_{ir}3.2$, $K_{ir}3.1/K_{ir}3.3$ ou $K_{ir}3.2/K_{ir}3.3$ (González et al., 2012).

Les GIRK sont activés par les sous-unités $\beta\gamma$ des protéines G_i ou G_o qui viennent se fixer sur la partie N et C-terminale du canal (He et al., 1999) (Figure 12) suite à l'activation du récepteur couple aux protéines G (RCPG).

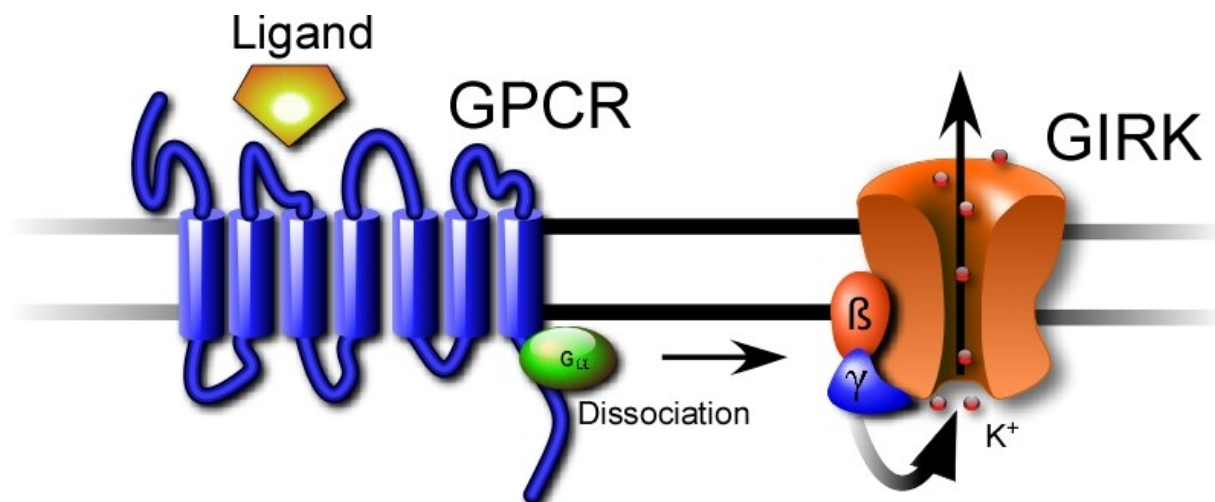


Figure 12: Activation des canaux GIRK par les récepteurs couplés aux protéines G. C'est l'interaction directe du canal avec les sous-unités $\beta\gamma$ qui permet de réguler le canal.

Comme pour la famille précédente, le PIP_2 joue un rôle important dans la régulation de ces canaux. En effet, l'action des $G\beta\gamma$ a besoin du PIP_2 pour activer les canaux GIRK (Huang et al., 1998). Les canaux GIRK peuvent aussi être régulés par le sodium intracellulaire et la phosphorylation *via* la protéine kinase A (PKA) (Ho and Murrell-Lagnado, 1999; Müllner et al., 2000).

On retrouve ces canaux notamment dans le cœur, le cerveau et le pancréas. $K_{ir}3.1$ et $K_{ir}3.4$ forment dans le cœur le canal K_{ACH} . Celui-ci est sensible à l'acétylcholine (ACh) provenant du nerf vague et permet de diminuer le rythme cardiaque. Dans le pancréas, l'activation des canaux GIRK par les catécholamines et les somatostatines permet d'arrêter la sécrétion de l'insuline par les cellules β (Iwanir and Reuveny, 2008). Enfin, dans le cerveau, on retrouve surtout les GIRK dans les épines dendritiques au niveau post et pré-synaptique où ils permettent la génération de potentiels post-synaptiques inhibiteurs induits par l'activation des récepteurs $GABA_B$ (Lüscher et al., 1997).

1.1.3.2.3 Les canaux sensibles à l'ATP ou $K_{ir}6.X$

Ces canaux, aussi appelés K_{ATP} , montrent une faible rectification entrante et sont ouverts de manière constitutive dans le pancréas. C'est l'état énergétique de la cellule, soit le rapport entre la concentration d'ATP et d'ADP, qui va réguler les K_{ATP} . Lorsque la concentration intracellulaire en ATP augmente, cela va inactiver le canal. Ces canaux sont composés de 4

sous-unités $K_{ir}6.X$ et de 4 sous-unités de récepteurs sulfonylurées (SUR1, SUR2A et SUR2B), formant ainsi un hétéro-octomère (Clement et al., 1997). Les sous-unités K_{ir} forment le pore du canal et sont inhibées par l'ATP. Les sous-unités SUR possèdent des sites de fixation à l'ADP et peuvent activer les K_{ATP} .

Ces canaux jouent un rôle crucial dans les cellules β du pancréas où ils fixent le potentiel de membrane et modulent ainsi la sécrétion de l'insuline en fonction de la balance ATP/ADP (Ashcroft and Rorsman, 1989). Lorsque les taux de glucose circulant sont faibles la concentration en ADP est plus importante que celle en ATP. Ainsi les sous-unités K_{ATP} ne sont pas inhibées par l'ATP elles sont au contraire activées par les sous-unités SUR grâce à l'ADP.

Lorsque le taux en glucose circulant augmente la balance ATP/ADP change, la concentration en ATP augmente alors que celle en ADP diminue. Les canaux perdront l'activation induite par les sous-unités SUR et seront en plus inhibés par l'ATP augmentant dans le milieu intracellulaire. Cela entraîne une dépolarisation de ces cellules et l'entrée de Ca^{2+} via les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant de type L. Cela a pour conséquence la fusion des vésicules avec la membrane plasmique et ainsi la libération de l'insuline (Figure 13).

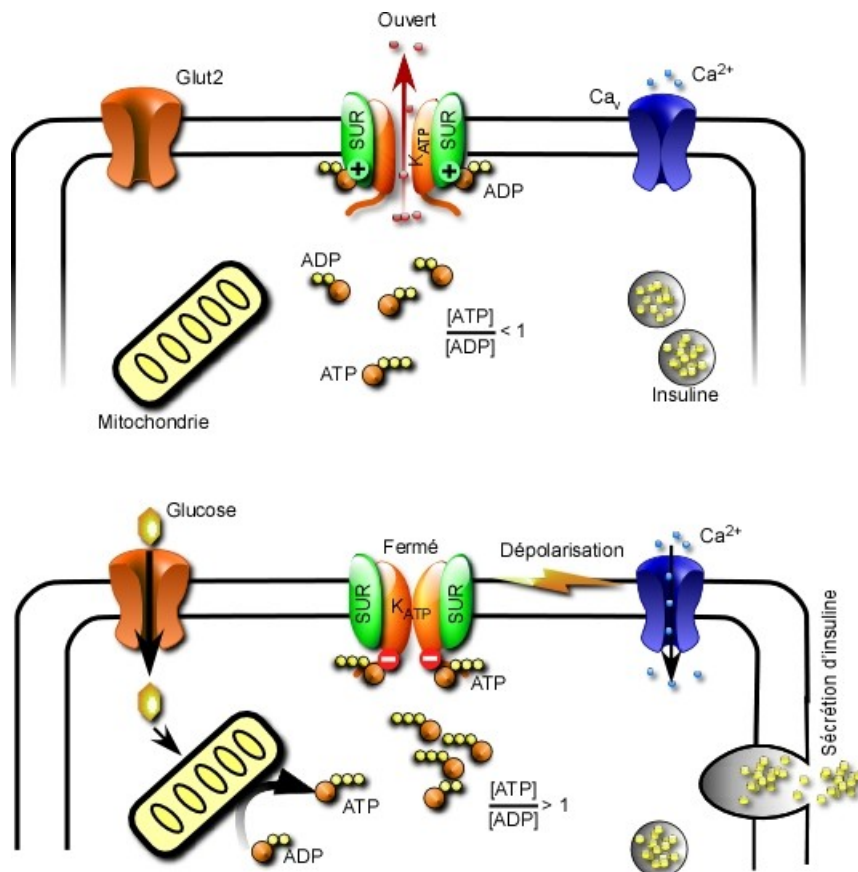


Figure 13: Implication des K_{ATP} dans le contrôle de la sécrétion d'insuline. Lorsque la balance ATP/ADP est en faveur de l'ADP, ce dernier se fixe sur les sous-unités auxiliaires SUR et active le canal. Cela permet de maintenir la cellule dépolarisée et les canaux Ca_v fermés. En présence de glucose la concentration en ATP augmente. Celui-ci va se fixer sur le canal et l'inhiber, entraînant alors la dépolarisation de la cellule, l'ouverture des canaux Ca_v et la fusion des vésicules contenant l'insuline.

Enfin, on retrouve ces canaux dans le cœur où ils ont un rôle de protection contre les ischémies (Nichols and Lederer, 1991).

1.1.3.2.4 Les canaux à rectification entrante activés par l'ATP et les autres K_{ir} ou $K_{ir1.1}$, $K_{ir4.X}$ (1 et 2), $K_{ir5.1}$ et $K_{ir7.1}$

$K_{ir1.1}$: Anciennement appelé ROMK1, on retrouve ces canaux surtout dans les cellules polarisées (cellules rénales). Ils y jouent un rôle important dans le maintien du potentiel de membrane ainsi que dans la régulation de l'homéostasie potassique. Des mutations dans le gène codant pour le canal $K_{ir1.1}$ ont été associées au syndrome de Bartter (hyperprostaglandine E syndrome) (Schulte et al., 1999).

$K_{ir4.X}$ et $K_{ir5.1}$:

Cette sous-famille est surtout exprimée dans les cellules gliales et du côté basolatéral des cellules rénales du tubule contourné distal. Ils y jouent un rôle dans le contrôle de l'homéostasie potassique. $K_{ir5.1}$ n'as pas de courant à l'état d'homéomère, il s'associe avec $K_{ir4.1}$ et 4.2 sous forme d'hétéromère pour leur donner de nouvelles propriétés biophysiques (González et al., 2012).

$K_{ir7.1}$:

Le canal $K_{ir7.1}$ génère des courants très faibles qui sont activés par PIP2. De plus, ces courants montrent une sensibilité "en cloche" pour le pH intracellulaire. L'activité de ces canaux est maximale à pH physiologique. Elle diminue lorsque le pH devient acide ou basique (Hughes and Swaminathan, 2008).

1.1.3.3 TMEM175

Cloné en 2015 par Cang et collaborateurs, TMEM175 est responsable de la plus grande partie du courant potassique des organelles (K_{EL}). Il est le premier membre d'une famille que l'on retrouve dans les 3 grands ordres du vivant (Eucaryote, Bactéries et Archea). Il possède 2 séquences répétées de 6 domaines transmembranaires et a la particularité de ne pas posséder de domaines pore (GY/F/LG). Les auteurs pensent que la sélectivité au potassium se fait grâce au premier domaine transmembranaire. TMEM175 joue un rôle dans la stabilité du pH du lumen des organelles et dans l'autophagie (Cang et al., 2015).

I.2 Les canaux Potassiques à deux domaines P K_{2P}

I.2.1 Les courants de fuites

Dans leur analyse quantitative des mécanismes du potentiel d'action dans le neurone de calamar, Hodgkin et Huxley introduisent la notion de conductance sélective de fuite. Celle-ci a un courant ionique égal à zéro au potentiel de membrane (Hodgkin and Huxley, 1952b)

Qu'est-ce qu'un canal de fuite? Les canaux potassiques de fuite ont été décrits comme étant des pores constitutivement ouverts. Un courant de fond K^+ idéal n'est pas voltage dépendant dans le sens où sa probabilité d'ouverture (P_0) est la même quel que soit la valeur du

potentiel de membrane. La P_0 est aussi indépendante de la concentration en K^+ de part et d'autre de la membrane. Une autre caractéristique des courants de fond est que l'amplitude du courant suit instantanément les changements de potentiel de membrane c'est-à-dire qu'il n'y a pas de dépendance au temps ou que le canal n'a pas de cinétique d'activation, de désactivation et d'inactivation. Toutes ces caractéristiques font que la relation voltage-courant peut être décrite par l'équation de Goldman, Hodgkin et Huxley (GHK) (Enyedi and Czirják, 2010).

$$E_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na^+} [Na^+]_{ext} + P_{K^+} [K^+]_{ext} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{int}}{P_{Na^+} [Na^+]_{int} + P_{K^+} [K^+]_{int} + P_{Cl^-} [Cl^-]_{ext}} \right)$$

Équation 2: Equation de GHK. P_i est la perméabilité de la membrane pour l'espèce i . $[i]$ est la concentration de l'espèce i dans le compartiment externe ou interne. R est la constante des gaz parfaits. T est la température en kelvin. F est la constante de Faraday

Cette équation a été posée bien avant que la nature des canaux ne soit connue. Elle est basée sur la théorie des champs constants. Elle a d'abord été appliquée à la totalité de la membrane cellulaire; permettant de déterminer les changements de perméabilité ionique dans les cellules nerveuses. Elle fut ensuite reprise dans le contexte plus restreint du canal ionique. Cette équation suppose que les ions ne sont dirigés que par le champ électrique. De plus les ions sont sensés traverser la membrane de manière indépendante, c'est-à-dire sans interagir entre eux.

L'équation de GHK prédit que la conductance dépend de la concentration en ions de chaque côté de la membrane. Quand le flot d'ions va de la partie la moins concentrée à la plus concentrée, la conductance est plus basse que dans le cas inverse. Cela a pour conséquence que la relation voltage-courant des canaux potassiques doit avoir une forte rectification sortante dans les conditions physiologiques. De plus celle-ci devrait être linéaire lorsque la concentration en potassium est symétrique de part et d'autre de la membrane (Figure 14).

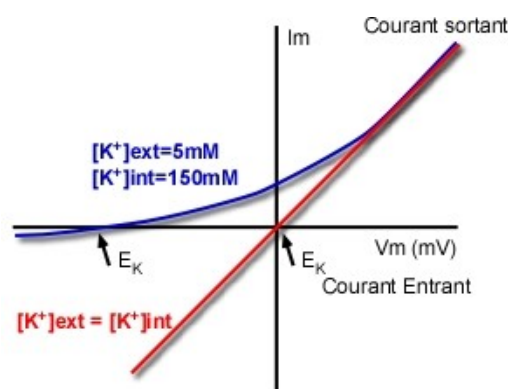


Figure 14: Les courants potassiques de fond décrits par l'équation de GHK. En condition physiologique la courbe courant-potentiel (I/V) en bleu croise l'axe des abscisses au niveau d'une valeur de potentiel proche du potentiel d'équilibre de l'ion potassium ($E_K = -80mV$). En condition de symétrie de potassium de part et d'autre de la membrane, la courbe I/V (rouge) croise l'axe des abscisses pour une valeur égale à $0mV$.

Au début des années, 80, un courant rectificant potassique chez l'aplysie (Klein and Kandel, 1980; Klein et al., 1980) été décrit. Ce courant, aussi appelé « S-current », est impliqué dans des processus simples de mémoire et d'apprentissage (Klein and Kandel, 1980). Dans les années qui suivirent, d'autres courants de ce type ont été décrits dans d'autres organismes comme par exemple chez l'escargot *Lymnazastagnalis* où Franks et Lieb caractérisent un courant potassique sensible à l'halothane (Franks and Lieb, 1988).

I.2.2 Les canaux K_{2p}

C'est à la fin des années 90, avec le séquençage systématique de plusieurs organismes que la famille des K_{2p} a pu être décrite et clonée. En comparant la séquence du filtre de sélectivité (domaine P) des canaux potassiques avec les bases de données Ketchum et collaborateurs identifièrent en 1995 dans *Saccharomyces cerevisiae* le premier canal potassique avec deux domaines pore. Ce canal, TOK1, possède deux boucle P et 8 segments transmembranaires (Ketchum et al., 1995). A la suite de ça, en 1996, les laboratoires du Pr Michel Lazdunski à l'Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC) et de Steve Goldstein ont mis en évidence les premiers canaux potassiques à 2 domaines P (K_{2p}), respectivement chez les mammifères et la drosophile (Goldstein et al., 1996; Lesage et al., 1996a).

Les K_{2p} se caractérisent par la présence de 4 domaines transmembranaires (M1-M4), de deux domaines formant le pore (P1 et P2) et d'une région extracellulaire importante reliant les domaines M1 et P1. Les domaines N- et C-terminaux ainsi que la boucle cytoplasmique reliant M2 et M3 jouent des rôles primordiaux dans la régulation des K_{2p} . Etant donné que le filtre de sélectivité au potassium doit être composé de 4 domaines pores, ces canaux dimèrisent pour être fonctionnels.

I.2.3 Est-ce bien des canaux de fuite?

Les K_{2p} sont souvent décrits comme des canaux de fuite, ou encore canaux de fond. Mais c'est peut-être un peu réducteur par rapport à leurs réelles implications. Les canaux de fuites doivent générer un courant qui suit l'équation de GHK, équation qui a souvent été utilisée avec succès comme point de départ pour essayer de décrire les relations courant-voltage et caractériser le courant généré par les K_{2p} . Ainsi certain courant de K_{2p} comme TASK1 et 3 (Duprat et al., 1997), TRAAK (Lesage et al., 2000a) et TALK (Girard et al., 2001) peuvent être décrit avec cette équation.

Cependant l'équation de GHK ne décrit que la forme du courant et non les mécanismes mis en jeu. En effet les hypothèses sous-entendues par cette équation se sont avérées incorrectes. Les ions ne bougent pas de manières indépendantes mais interagissent avec le filtre de sélectivité. Enfin la probabilité d'ouverture de la plupart des canaux ioniques, dont les K_{2p} , est voltage et temps dépendant (Renigunta et al., 2015) .

Dans le cas de TASK-1 les enregistrements des canaux isolés ont pu révéler qu'en condition de symétrie de potassium la relation voltage-courant est rectificant entrante et la probabilité

d'ouverture augmente avec la dépolarisation (Kim et al., 1999)(Figure 15). Ces deux effets contribuent à la forme macroscopique de la relation courant-voltage. Toujours dans la sous-famille TASK, TASK-3 ne suit en réalité qu'approximativement l'équation de GHK (Enyedi and Czirják, 2010). Le courant rectifiant sortant observé en condition physiologique est la conséquence d'une part de la rectification entrante au niveau canal unitaire en condition Iso K et d'autre part de l'augmentation de la P_0 lors de la dépolarisation (Rajan et al., 2000).

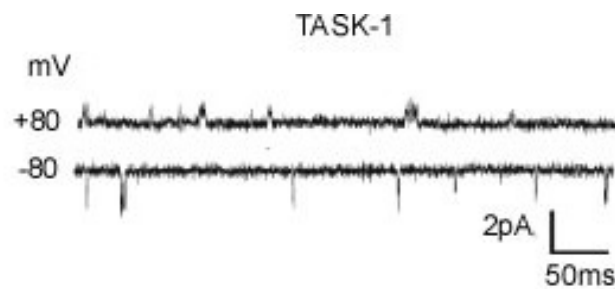


Figure 15: Courant unitaire TASK1 obtenu à partir d'enregistrements en configuration "outside-out" de cardiomyocytes ventriculaires de rat et en condition de symétrie de potassium. A -80mV la conductance unitaire est plus importante qu'à +80mV. Cependant la probabilité d'ouverture est plus faible à -80mV qu'à +80mV. Modifié à partir de Renigunta et al., 2015.

Certains K_{2p} présentent une activation dépendante du temps. Par exemple, lorsque TREK-1 est activé par des étapes de dépolarisation, il montre une composante instantanée suivie d'une composante dépendante du temps. Lors de la repolarisation une queue de désactivation peut être observée (Maingret et al., 2002).

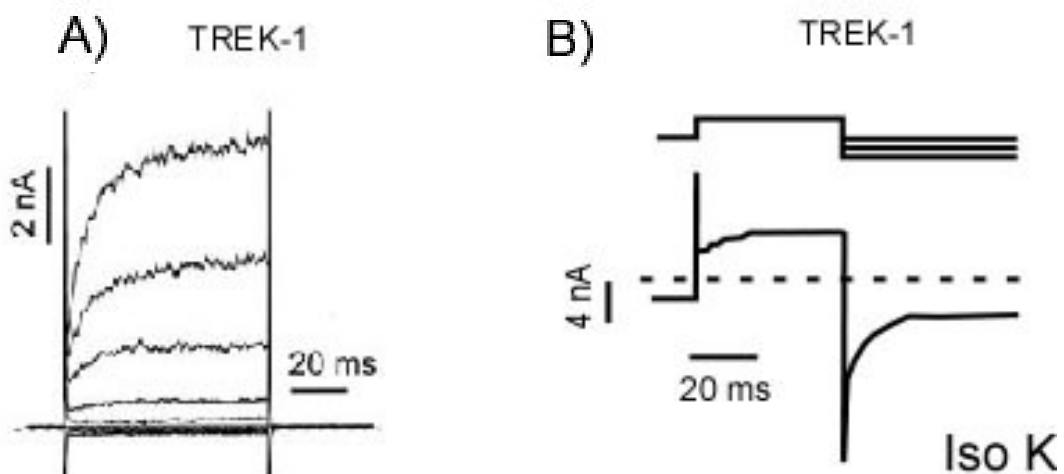


Figure 16: Dépendance du courant TREK-1 en fonction du temps et du voltage. (A) Courants mesurés en configuration cellule entière dans des conditions physiologiques de potassium. La dépolarisation à des potentiels positifs induit une activation dépendante du temps de TREK-1. (B) En condition de symétrie de potassium, après une dépolarisation à 100 mV une étape d'hyperpolarisation induit une queue de désactivation. Modifié à partir de Maingret et al., 2002.

Enfin une des caractéristiques les plus remarquables des K_{2P} est leurs régulations très complexes *via* un grand nombre de *stimuli* différents.

Pour toutes ces raisons les K_{2P} ne peuvent pas être considérés comme des simples canaux de fuite. Il est peut-être préférable de les considérer sous le terme de "canaux potassiques régulateurs" (Renigunta et al., 2015).

1.2.4 Diversité des K_{2P}

Après la découverte des premier K_{2P} en 1995-96 et grâce aux comparaisons avec les séquences des bases de données, plusieurs autres canaux correspondant à cette famille ont été clonés. Malgré le fait qu'ils possèdent tous la même topologie et le même rôle général dans le maintien du potentiel de membrane, il est apparu évident que cette famille est très hétérogène au niveau de leur séquence protéique qui est peu conservée en dehors du domaine pore. Cette diversité se reflète sur leurs caractéristiques fonctionnelles (Figure 17).

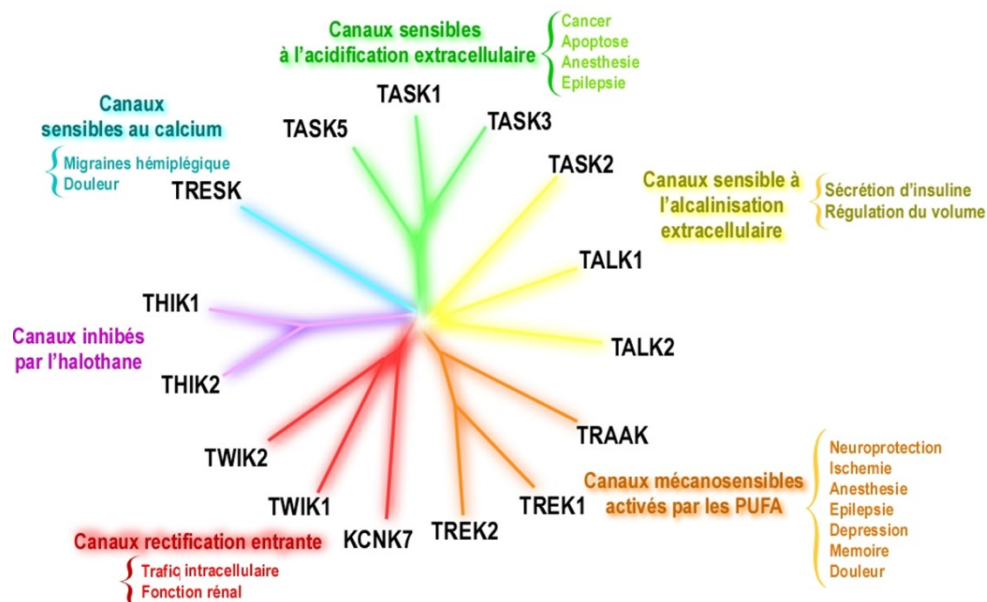


Figure 17: Diversité des canaux potassiques à deux domaines pore. L'arbre phylogénétique des sous-unités des canaux K_{2P} met en évidence l'existence de 6 sous-familles de canaux K_{2P} aux caractéristiques biophysiques et pharmacologiques distinctes.

1.2.4.1 Classification

A ce jour on compte 15 membres dans cette famille chez les mammifères. Les différents membres sont classés en 6 sous-familles en fonction de leurs similarités de fonction et de leur homologie de séquence.

Les TWIK ("Tandem of P domains in a Weak Inwardly rectifying potassium (K⁺) channel")

Les TREK ("TwikRELATED K⁺ channel")

Les TASK (Twik-related Acid-Sensitive K⁺ channel)

Les TALK (Twik-related ALKalin pH activated K⁺ channel)

Les THIK (Twik-related Halothane Inhibited K⁺ channel)

Les TRESK (Twik-RELATED Spinal cord K⁺ channel)

Lors de ma thèse j'ai travaillé plus précisément sur la sous-famille TREK. C'est pour cela que j'en parlerai plus précisément dans un chapitre dédié. Je présenterai ici les différentes sous-familles de K_{2P} ainsi que leurs membres. Nous verrons leurs caractéristiques biophysiques, leurs régulations et leurs implications physiologiques.

1.2.4.2 Sous-famille TWIK

Cette sous-famille est composée de 3 membres : TWIK1, TWIK2 et KCNK7. TWIK1 fut le premier K_{2P} cloné chez les mammifères en 1996 par Florian Lesage (Lesage et al., 1996a). TWIK est l'acronyme de "Tandem of pore domains in a Weak Inwardly rectifying potassium (K^+) channel". Les canaux de cette sous-famille ont la particularité de générer de faibles, voir pas de courant lorsqu'ils sont exprimés dans des systèmes d'expression hétérologue. Cela a rendu difficile la caractérisation de leurs propriétés fonctionnelles.

Le faible courant généré par TWIK1 et KCNK7 peut être expliqué par leur localisation subcellulaire. KCNK7 est surtout retrouvé dans le réticulum endoplasmique des cellules (Salinas et al., 1999) alors que TWIK1 est en mouvement constant entre la membrane plasmique et les vésicules de recyclage (Felicangeli et al., 2010).

1.2.4.2.1 TWIK1

Premier K_{2P} cloné en 1996 grâce au séquençage automatique de plusieurs organismes. Outre l'architecture commune aux autres K_{2P} (4 segments transmembranaires et 2 boucles P) TWIK1 possède un site de N-Glycosylation (extracellulaire) et 3 séquences consensus de phosphorylation (un par la Calmoduline-kinase, un par la PKC, et un par la caséine-kinase) (Lesage et al., 1996a). Les courants générés par ce canal s'activent instantanément. Ils présentent une composante rapidement inactivée en condition de symétrie en K^+ (IsoK). Cette caractéristique confère à la courbe I/V une forme similaire à celle des canaux K_{ir} (Patel et al., 2000). Les courants TWIK peuvent être inhibés par le Ba^{2+} , la quinine et la quinidine. Cependant l'absence de courant important a retardé l'étude plus approfondie des propriétés de ce canal.

TWIK1 est exprimé dans le SNC (hippocampe, putamen, noyau réticulaire du thalamus et cervelet) et au niveau périphérique dans les poumons, le foie, le pancréas, le placenta et l'oreille interne (Lesage et al., 1996a; Medhurst et al., 2001a; Nicolas et al., 2003). Enfin, on le retrouve essentiellement dans le rein et plus précisément dans le néphron.

Grâce à des études sur l'expression native de TWIK dans des cellules de rein et son expression hétérologue dans des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney), la localisation subcellulaire de ce canal a pu être déterminée. Il est apparu que TWIK1 est de manière constitutive rapidement internalisé avant d'être stocké dans des endosomes de recyclage (Figure 18 A). C'est le modeste *pool* de canaux néo-synthétisés présent à la membrane qui est responsable des petits courants observables dans les systèmes d'expression hétérologue (Decressac et al., 2004; Felicangeli et al., 2007, 2010). Cette endocytose provient d'un signal présent sur la protéine. Celui-ci est constitué de deux isoleucines en position 193 et 194. En

mutant ces deux résidus le canal peut aller à la membrane et générer du courant. C'est entre autre grâce à ce mutant qu'il a été déterminé que TWIK-1 possède la propriété de changer de sélectivité lors de l'acidification du milieu extracellulaire (Chatelain et al., 2012; Ma et al., 2011) (Figure 18 B).

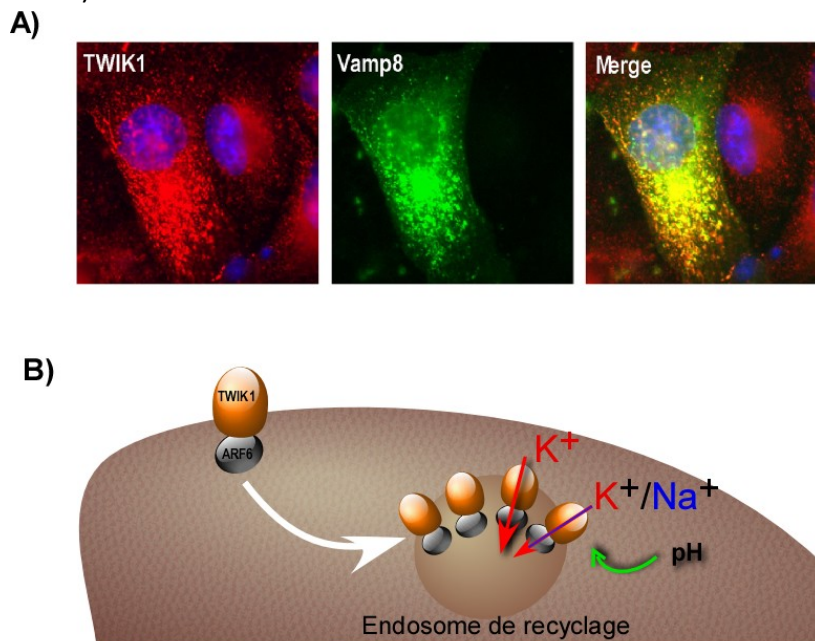


Figure 18: TWIK1: un K_{2p} présent au niveau des endosomes de recyclage et pouvant changer de sélectivité en fonction du pH. (A) Co-immunolocalisation de TWIK1 (anti-TWIK1 rouge) et vamp8-GFP (vert) exprimés dans les cellules MDCK. Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu). La superposition des marquages TWIK1 et Vamp8 montre une co-localisation (jaune). D'après Decressac et al. 2004. (B) Schéma représentant la localisation de TWIK1 dans les endosomes de recyclage et la modification de sa sélectivité par le pH.

TWIK1 peut être régulé, comme d'autres K_{2p} , par des variations intra- et extracellulaires de pH (Rajan et al., 2005; Yost et al., 2008).

Une souris Knock Out (KO) pour TWIK1 a été développée. Il semblerait que ce canal ait un rôle dans la fonction rénale (Nie et al., 2005). Il influencerait le trafic intracellulaire, entre autre de l'aquaporine 2. Il a aussi été montré que TWIK1 joue un rôle dans les douleurs neuropathiques (Pollema-Mays et al., 2013).

1.2.4.2.2 TWIK2

Il possède une très faible conductance ne permettant pas l'enregistrement unitaire. Il possède une rectification sortante en condition physiologique et une légère rectification sortante en IsoK. On peut noter que sa cinétique d'inactivation pour les fortes dépolarisations est dépendante de la température (Patel et al., 2000). TWIK-2 est majoritairement exprimé au niveau du tractus gastro-intestinal, du système vasculaire et immunitaire mais on peut aussi le retrouver dans le cœur, le poumon, le pancréas et le foie (Patel et al., 2000). Ce canal peut être inhibé par la quinine, la quinidine et le baryum (Patel et al., 2000).

Il semblerait que TWIK-2 soit impliqué dans l'hypertension pulmonaire *via* un mécanisme dépendant de la kinase-Rho (Pandit et al., 2014).

1.2.4.2.3 KCNK7

KCNK7 n'est pas capable de générer un courant dans les différents systèmes d'expression hétérologue (Ovocyte de xénope ou lignées cellulaires mammifères) (Bockenbauer et al., 2001; Salinas et al., 1999). On peut retrouver ce canal dans de nombreux tissus, notamment dans les cellules ganglionnaires de la rétine et le SNC (Medhurst et al., 2001a). Son expression au niveau du réticulum endoplasmique peut expliquer cette absence de courant.

On peut noter que KCNK7 possède un motif de fixation au calcium (EF-Hand) au niveau de son domaine C-terminale. De plus le filtre de sélection possède une séquence atypique, GLE au lieu de G[Y/F/L]G. Enfin, une souris KO a été générée, celle-ci ne présente pas de phénotypes apparents, ni de différence de sensibilité aux anesthésiques volatiles. (Yost et al., 2008).

1.2.4.3 TASK: sensible à l'acidité extracellulaire

Les canaux TASK pour Twik-related Acid-Sensitive K⁺ channel ont été la troisième sous-famille à être identifiée. On compte 3 membres, TASK1, TASK3 et TASK5. TASK 1 et 3 génèrent de grands courants alors que TASK-5 lui ne produit pas de courant dans les systèmes d'expression hétérologue (Ashmole et al., 2001). TASK5 a la particularité de posséder une séquence EYG (Kim and Gnatenco, 2001) au niveau de son premier domaine pore au lieu du classique G[Y/F/L]G. Une mutation similaire dans le domaine pore du canal K_{ir}3.4 induit une perte de sélectivité (Mulatero et al., 2012). TASK-5 serait une sous-unité inactive ou un canal avec une sélectivité altérée de manière permanente (Bichet et al., 2015).

Les canaux TASK1 et 3 ont des courants potassiques qui s'activent spontanément et qui sont dépourvus d'inactivation (Duprat et al., 1997). Ceux-ci suivent les courants théoriques prédits par l'équation de GHK. On les retrouve principalement au niveau du SNC (hippocampe et cervelet) mais TASK1 est également exprimé dans le cœur, les poumons, l'estomac et les reins (Chapman et al., 2000; Zirják and Enyedi, 2002; Kim et al., 1999). TASK5 est exprimé au niveau du cerveau, notamment dans le système nerveux auditif et est dit non fonctionnel (Karschin et al., 2001).

1.2.4.3.1 Régulations

Comme leur nom l'indique ces canaux sont sensibles aux variations extracellulaires de pH. Cette sensibilité est visible dans les gammes de pH physiologique (Figure 19 A et B). Des expériences de mutagenèses dirigées ont permis de déterminer que les histidines 72 et 98 ainsi que la lysine 210 sont responsables de cette sensibilité. Ces acides aminés sont sur la boucle extracellulaire reliant les domaines M1 et M2 et celle reliant P2 au domaine M4 (Morton et al., 2003). Pour TASK3 c'est seulement la protonation de l'histidine 98 à

proximité du filtre de sélectivité qui est responsable de cette sensibilité, expliquant ainsi pourquoi TASK3 est moins sensible que TASK1.

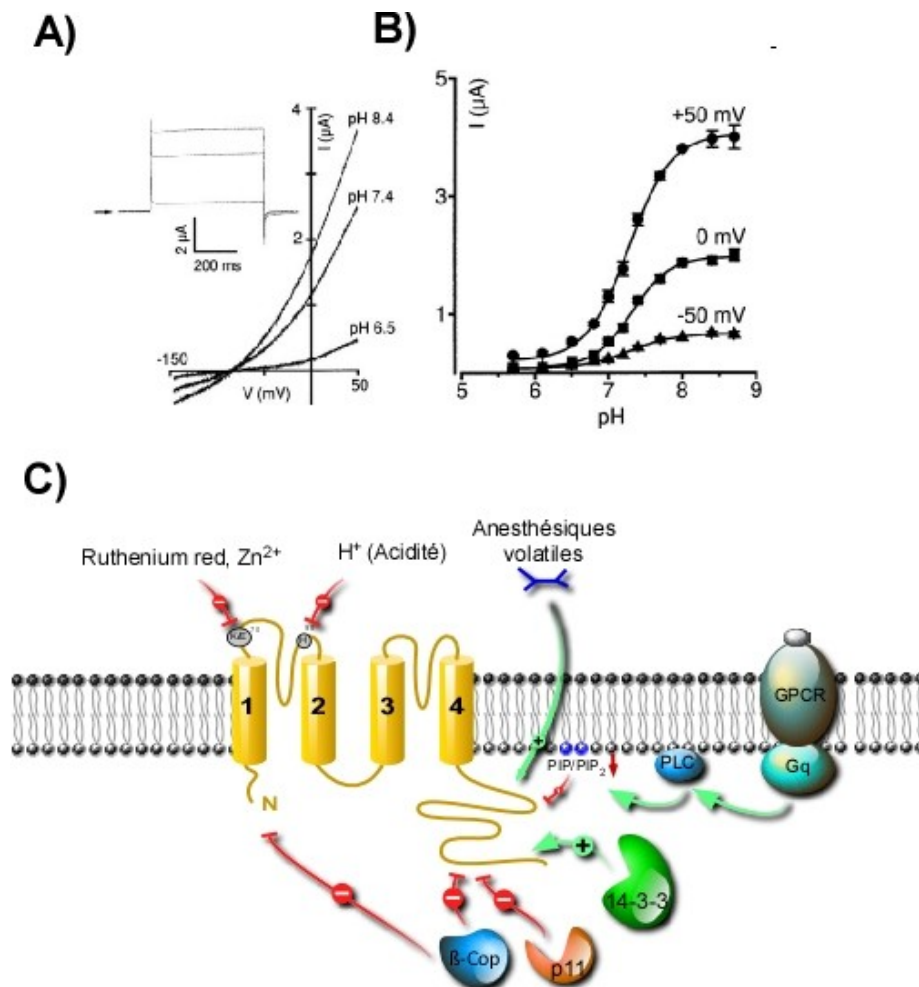


Figure 19: Régulation des canaux TASK. (A) Relation voltage/courant des canaux TASK exprimés dans l'ovocyte de xénope en fonction du pH extracellulaire. (B) Dépendance du courant TASK en fonction du pH et du potentiel de membrane dans les ovocytes de xénope. Modifié à partir de Duprat et al., 1997. (C) Schéma représentant les différentes régulations des canaux TASK.

Ces canaux sont peu sensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques tels que le Ba²⁺, le Cs⁺, le TEA et la 4-AP. On peut noter qu'ils sont inhibés par l'anandamide et par des anesthésiques locaux comme le bupivacaïne (Morton et al., 2003). Ils sont également sensibles aux anesthésiques volatiles mais pas de la même manière. En effet TASK1 est stimulé par l'halothane et le xénon alors que TASK3 peut être activé par l'halothane, l'isoflurane et le chloroforme (Patel et al., 1999).

Les courants TASK peuvent être inhibés de deux manières par les récepteurs couplés aux protéines G de type Gq. Tout d'abord par l'interaction directe entre le canal et les Gαq. Ensuite *via* l'activation de la phospholipase C (PLC) qui va induire la déplétion en PIP₂ de la

membrane plasmique, inhibant ainsi de manière indirecte le canal (Chemin et al., 2003; Czirják and Enyedi, 2002a; Millar et al., 2000).

Enfin ces canaux peuvent être régulés *via* leur transport à la membrane. TASK1 et 3 possèdent des sites d'interaction (en C et N terminale) avec la protéine β COP. Cette sous-unité du complexe COP-1 est responsable de la rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique. Lors de l'adressage des canaux à la membrane, cette interaction est déplacée par la fixation compétitive avec la protéine 14-3-3 en région C-terminal (O'Kelly et al., 2002; Rajan et al., 2002). Une sous-unité du complexe annexine II, P11, semble aussi être impliquée dans le transport du canal à la membrane plasmique en présence de 14-3-3 (Girard et al., 2002; O'Kelly and Goldstein, 2008) (Figure 19 C).

1.2.4.3.2 Rôles physiologiques

Les canaux TASK sont surtout impliqués dans la sensibilité aux *stimuli* chimiques, dans la sécrétion hormonale, la prolifération et la mort cellulaire.

Du fait de leur sensibilité au pH extracellulaire et de leur expression dans des structures sensibles à l'oxygène, il a été proposé que les canaux TASK ont un rôle dans la chimiosensibilité (Bayliss et al., 2001). Lors d'une hypoxie la première réponse réflexe est l'augmentation du rythme respiratoire. Ce réflexe est dû entre autres aux cellules du glomus de type I, présentes au niveau des corpuscules carotidiens et aortiques, qui en réponse à l'hypoxie et l'augmentation de l'acidité activent des fibres sensorielles. Celles-ci iront activer à leur tour les centres de la respiration et ainsi augmenter la ventilation. Un courant ionique clef de cette activation est un courant potassique sensible à l'acidification extracellulaire; celui-ci ayant les mêmes caractéristiques que les courants TASK (Buckler et al., 2000).

Les TASK sont aussi impliqués dans la sécrétion de l'aldostérone par les surrénales *via* l'angiotensine II (AngII). Lors d'un déficit en sodium, l'augmentation de l'angiotensine II circulante inhibe les canaux TASK *via* les Gq. Cela entraîne une dépolarisation qui induit la synthèse d'aldostérone (Czirják and Enyedi, 2002a; Czirják et al., 2000; Lotshaw, 2006). On peut noter que les souris TASK1^{-/-} présentent une hyperaldostéronémie associée à une hypokaliémie et une hypertension (Heitzmann et al., 2008).

Les souris KO pour les TASK ont permis de mettre en évidence leur implication dans la nociception. La souris TASK^{-/-} montrent une sensibilité accrue aux tests de nociception « hot-plate » mais pas dans le test du tail-flick. De plus les effets analgésiques, sédatifs et hypothermiques des cannabinoïdes sont réduits (Linden et al., 2006). Ces résultats suggèrent que le canal TASK, exprimé dans la voie supraspinale, est impliqué dans le comportement nocicepteur. Durant l'inflammation, les niveaux d'acide ribonucléique (ARN messenger) de TASK1 et 3 sont réduits. Cette diminution est associée à une douleur spontanée (spontaneous foot lifting) (Marsh et al., 2012). Ces résultats montrent que l'inhibition de TASK1 et TASK3 est corrélée aux douleurs neuropathiques induites par l'inflammation. Enfin

TASK3 est exprimé dans les neurones exprimant TRPM8 et on peut noter une diminution de leur seuil d'activation chez la souris KO (Morenilla-Palao et al., 2014). Tous ces résultats suggèrent que TASK3 peut être impliqué dans l'hypersensibilité au froid durant l'inflammation.

1.2.4.4 TALK sensible au pH basique

Cette sous-famille comporte 3 membres : TASK-2, TALK-1 et TALK-2/TASK-4. Initialement TASK-2 et TASK-4 étaient classés dans la famille des TASK compte tenu de leur faible homologie avec les autres familles de K_{2p} . Une fois que leur sensibilité à l'alcalinisation fut avérée ils furent reclassés dans la famille des TALK.

Les canaux TALK génèrent des courants qui suivent l'équation de GHK. Ils sont linéaires en condition symétrique de potassium avec une légère rectification sortante pour TALK-2 (Girard et al., 2001). On peut noter que l'enregistrement unitaire de ces courants montre une légère rectification entrante. (Han et al., 2003; Kang and Kim, 2004).

TASK-2 ne possède que 30% d'homologie avec TALK-1 et TALK-2 et ne présente pas les mêmes caractéristiques électrophysiologiques. En effet on peut observer une rectification entrante plus marquée en IsoK. Celle-ci est due au blocage du pore par un ion sodium (Morton et al., 2005). Il possède aussi une conductance plus grande et une durée d'ouverture plus longue (Kang and Kim, 2004).

TALK-1 et 2 sont surtout exprimés dans le pancréas alors que TASK-2 est principalement exprimé au niveau périphérique (foie, pancréas, rein et placenta). Dans le pancréas où les trois canaux sont exprimés, il a été observé que leur distribution est spatialement contrôlée. TASK-2 est réparti de manière ubiquitaire alors que TALK-1 et TALK-2 ne sont présents que dans les cellules exocrines. (Duprat et al., 2005)

1.2.4.4.1 Régulations

Comme leur nom l'indique les canaux TALK sont principalement régulés par une alcalinisation du milieu extracellulaire. Ils sont activés sur une plage de pH allant de 7,5 à 10. La régulation de TASK-2 par le pH vient d'une modulation de la probabilité d'ouverture du canal sans changement de la conductance du canal (Niemeyer et al., 2007; Rajan et al., 2000). Le senseur du pH de TASK-2 n'est porté que par un seul acide aminé au niveau de la boucle reliant les segments M3 et M4 : une arginine en position 224. Pour TALK-1 cette arginine est en position 333 (boucle entre M3 et M4 avant P2) alors que pour TALK-2 le résidu est une lysine en position 242 (même domaine que TALK-1) (Niemeyer et al., 2007).

TASK-2 est aussi régulé par le pH intracellulaire (alcalinisation). C'est une lysine en position 245 (domaine C-terminal) qui est responsable de cette sensibilité. Il est intéressant de noter que la sensibilité au pH extra- et intracellulaire sont deux mécanismes indépendants (Niemeyer et al., 2010).

Comme la plupart des K_{2P} , les canaux TALK sont sensibles aux anesthésiques volatiles bien qu'il y ait des différences entre les membres de la sous-famille. L'halothane et le chloroforme inhibent TALK-1 et TALK-2 mais activent TASK-2. L'isoflurane active TALK-1 et 2. TASK-2 peut être inhibé par la lidocaïne (Girard et al., 2001; Gray et al., 2000; Kindler et al., 2003).

Les canaux TASK-2 peuvent être inhibés par les sous-unités $G\beta\gamma$ des protéines G. Cette modulation provient d'une interaction entre les $G\beta\gamma$ et le canal au niveau des résidus lysines de son domaine C-terminal (Añazco et al., 2013).

Enfin TALK-1 et TALK-2 peuvent être activés par les dérivés du NO et les dérivés des réactifs de l'oxygène. Ceux-ci faciliteraient l'activation de ces canaux à pH physiologique (Duprat et al., 2005).

1.2.4.4.2 Rôles physiologiques

1.2.4.4.2.a TASK-2:

Il a été montré que TASK-2 est impliqué dans la régulation de la diminution du volume des cellules (regulatory volume decrease : RVD). En effet l'expression de TASK-2 dans des cellules Human Embryonic Kidney 293 (HEK 293) augmente la réponse RVD (Niemeyer et al., 2001). Cet effet a aussi été observé au niveau natif dans les cellules rénales du tubule proximal (Barriere et al., 2003) et dans la diminution du volume apoptotique qui précède la mort cellulaire (L'Hoste et al., 2007).

TASK-2 est aussi impliqué dans la réabsorption du bicarbonate rénal (Figure 20). En effet, tamponner le milieu intra- et extracellulaire est une fonction homéostatique centrale. Le bicarbonate joue le rôle de tampon principal dans le sang et ces niveaux sont finement régulés par les reins et les poumons. L'utilisation de souris KO TASK^{-/-} a permis de montrer que ce canal joue un rôle central dans cette régulation. Cela au niveau du tubule proximal (Warth et al., 2004) ainsi qu'au niveau des neurones sensibles à l' O_2 et au CO_2 permettant le contrôle de la respiration (Gestreau et al., 2010).

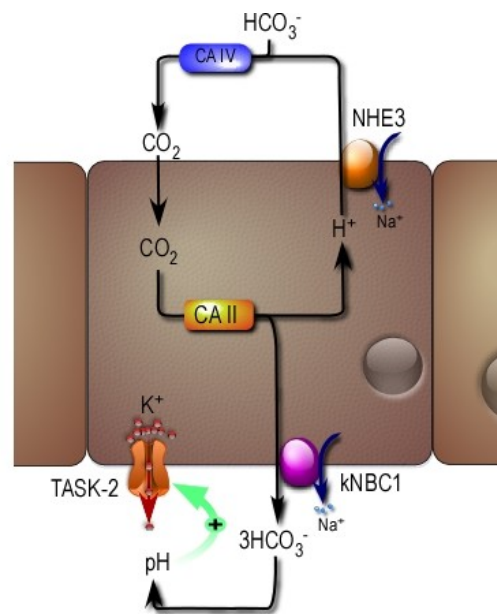


Figure 20: Implication de TASK2 dans le transport de bicarbonate au niveau des cellules rénales. La réabsorption du bicarbonate (HCO_3^-) du flux urinaire dans le compartiment sanguin fait intervenir l'échangeur Na^+/H^+ (NHE3) au niveau de la membrane apicale et le cotransporteur $\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$ au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales rénales. L'augmentation de bicarbonate dans le sang provoque une augmentation de pH qui active les canaux TASK2. Ces canaux interviennent dans le recyclage du K^+ intracellulaire accumulé par la pompe Na^+/K^+ ATPase et sont responsables de la repolarisation membranaire nécessaire au transport des bicarbonates. Modifié d'après Lesage et Barhanin, 2011.

1.2.4.4.2.b TALK-1 et 2:

TALK-1 joue un important rôle dans l'excitabilité des cellules β du pancréas. Un changement de l'activité de TALK-1 affecte la sécrétion d'insuline due au glucose et peut être une origine du diabète de type 2 (Vierra et al., 2015).

TALK-2 est aussi exprimé dans le cœur, en particulier au niveau du nœud artéri-ventriculaire et dans les fibres de Purkinje. Il a été montré que ce canal peut être un facteur associé aux arythmies (Friedrich et al., 2014).

1.2.4.5 THIK sensible à l'halothane

On compte 2 membres dans cette sous-famille : THIK-1 et THIK-2. C'est la sensibilité de THIK-1 pour l'halothane qui lui vaut cette appellation : Twik-related Halothane Inhibited K^+ channel.

De ces deux membres, seul THIK-1 génère un courant qui s'active instantanément sans inactivation et présente une faible rectification sortante en condition IsoK. Le courant THIK-1 peut être partiellement bloqué par le Ba^{2+} , par contre il est insensible au TEA (Rajan et al., 2001). C'est en mutant le signal d'adressage de THIK-2 que son courant a pu être enregistré. Celui-ci présente les mêmes propriétés que THIK-1 (Chatelain et al., 2013). Les canaux THIK sont inhibés par l'halothane et activés par l'acide arachidonique (Figure 21).

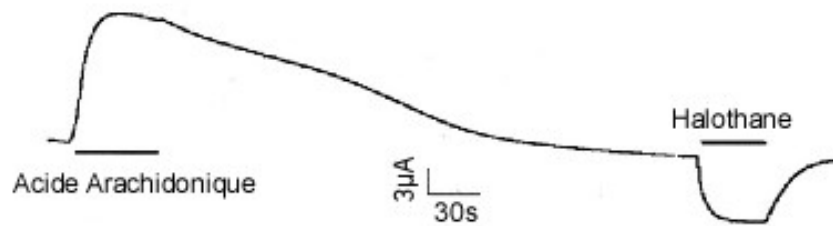


Figure 21: Régulation de THIK-1 par l'acide arachidonique et l'halothane. Enregistrement du courant en continu à +30mV dans des ovocytes de xénope. Modifié à partir de Rajan et al., 2001.

Cependant ils restent insensibles aux autres facteurs de régulation des K_{2P} comme le pH intra- et extracellulaire, les lisophospholipides et la température (Rajan et al., 2001). L'expression de THIK-1 est ubiquitaire (Rajan et al., 2001) avec une forte représentation dans les tubules proximaux et distaux du néphron (Theilig et al., 2008). THIK-2 quand à lui est exprimé dans le cœur, le muscle squelettique et le pancréas. (Girard et al., 2001).

1.2.4.5.1 Rôles physiologiques

Il a été mis en évidence dans les cellules de Purkinje un courant de fond résistant au TEA et présentant des caractéristiques pharmacologiques comparables à THIK-1. Celui-ci étant stimulé par l'acide arachidonique, inhibé par l'halothane et insensible aux variations de pH (Bushell et al., 2002). De même, un courant potassique non identifié est présent dans les neurones glosso-pharyngés. Ce courant partage les mêmes propriétés pharmacologiques que THIK-1 (Campanucci et al., 2003).

On peut noter que THIK-2 a une expression augmentée dans le striatum des rats ayant une addiction pour la nicotine (Yeom et al., 2005).

1.2.4.6 TRESK l'isolé

Cette famille ne possède qu'un seul membre TRESK pour Twik-RElated Spinal cord K^+ channel. Il a été cloné pour la première fois chez l'humain à partir de la moelle épinière (Sano et al., 2003). Il possède la même architecture que les autres K_{2P} (4 domaines transmembranaires et 2 boucles P). Cependant, la caractéristique qui le distingue des autres K_{2P} est une grande boucle intracellulaire entre les domaines transmembranaires M2 et M3 et un petit domaine C ter.

Comme la plupart des K_{2P} les courants TRESK sont instantanés et ne s'inactivent pas. Ils possèdent une rectification sortante en condition physiologique (Sano et al., 2003).

Le canal TRESK est exprimé dans le SNC comme les neurones des ganglions de la racine dorsale, les noyaux trigéminaux, le cervelet, le cortex et les ganglions sympathiques et parasympathiques (Bautista et al., 2008; Cadaveira-Mosquera et al., 2012; Czirják et al., 2004; Kang and Kim, 2006). On le retrouve aussi au niveau périphérique dans les testicules, la rate, le thymus, les poumons et le cœur (Czirják et al., 2004; Dobler et al., 2007).

1.2.4.6.1 Régulations

TRESK est régulé par le calcium intracellulaire. En effet l'activation du canal par le calcium est robuste et rapide (maximum attendu en 1 à 2min). De plus le retour à la normal est plus lent et on peut noter que le calcium n'a pas d'effet en patch excisé. Ces résultats laissent penser que l'action du Ca^{2+} sur TRESK est indirecte. Des expériences de pharmacologie et de co-expression ont montré que la calcineurine est impliquée dans cette régulation. Le canal TRESK est à l'état basal inhibé par la phosphorylation de la serine en position 276 et d'un groupement de serines en position 274, 276 et 279 localisées dans la boucle intracellulaire entre le domaine M2 et M3. En présence de calcium la calcineurine déphosphoryle les différentes serines induisant ainsi l'activation de TRESK (Czirják and Enyedi, 2006; Enyedi et al., 2012). A l'inverse, la phosphorylation par la kinase MARK favorise la fixation de la protéine 14-3-3 et contribue à inhiber le canal (Czirják et al., 2008) (Figure 22).

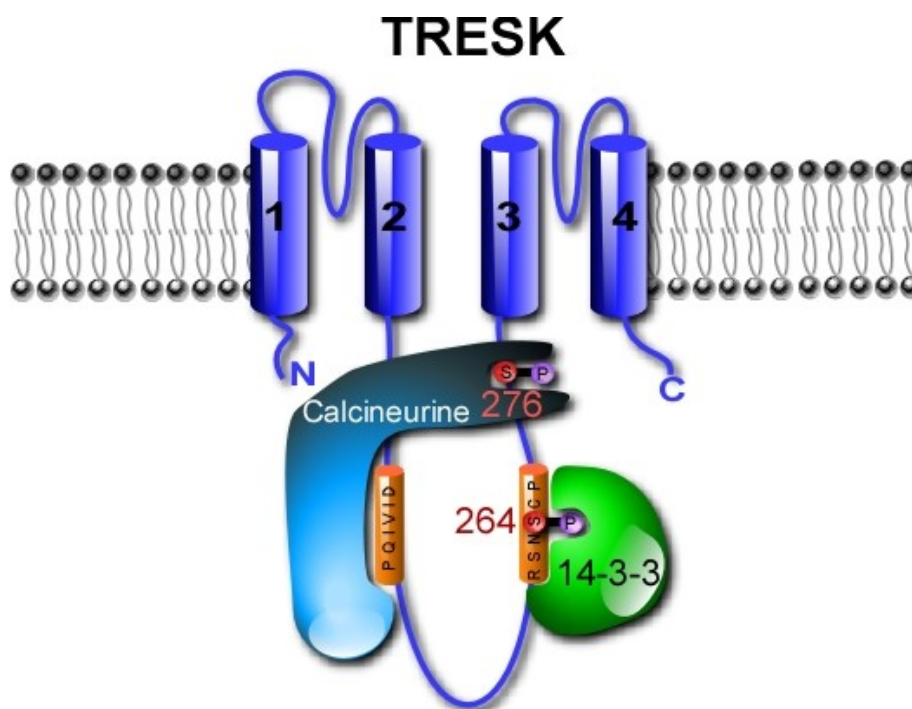


Figure 22: Régulation de TRESK par la calcineurine et la protéine 14-3-3. TRESK est phosphorylé sur deux sérines présentes au niveau de la boucle M2-M3: par la PKA au niveau de la serine 264 et par la MARK Kinase au niveau de la serine 276. Ces phosphorylations inhibent l'activité du canal. La phosphorylation par la PKA favorise la fixation de 14-3-3 sur le site RSNSCP et contribue à l'inhibition du canal. La calcineurine déphosphoryle ces deux phosphoserines produisant une activation du canal. La présence de 14-3-3 pourrait empêcher la déphosphorylation de S264 par la calcineurine (d'après Enyedi et al., 2010).

1.2.4.6.2 Rôles physio- et pathologiques

Plusieurs études montrent que TRESK joue un rôle important dans les neurones sensoriels des noyaux de la racine dorsale (DRG). C'est un composant majeur du potentiel de repos de ces cellules (Kang and Kim, 2006). Le KO fonctionnel de TRESK chez la souris induit une hyperexcitabilité de ces neurones (Dobler et al., 2007). Il a été montré que dans des modèles

de douleur neuropathique chez le rat, l'expression de TRESK est diminuée. De plus, l'utilisation de siRNA contre ce canal diminue le seuil de douleur d'un *stimulus* mécanique (Tulleuda et al., 2011). TRESK voit aussi son expression diminuée lors de l'inflammation (Marsh et al., 2012). Tous ces résultats montrent que TRESK joue un rôle important dans la nociception. Il a été proposé que son interaction avec la calcineurine pourrait être une cible pour le traitement des douleurs chroniques (Huang et al., 2008).

Il a été montré que des mutations de TRESK étaient présentes chez les patients atteints de migraines hémiplegiques familiales. Ces mutants sont des dominants négatifs de TRESK qui diminuent son activité dans les neurones trigéminaux (Lafrenière et al., 2010).

1.2.4.7 L'hétéromérisation des K_{2P}

L'hétéromérisation est un mécanisme commun dans la nature qui permet d'augmenter la diversité fonctionnelle des complexes protéiques. Les canaux potassiques ne font pas exception et leur grande diversité peut encore être augmentée par leur capacité à faire des hétéromères.

Par exemple les K_v sont bien connus pour hétéromériser entre canaux de la même famille (K_v1 , K_v7 , K_v10). Chez les K_v certaines sous-familles dites silencieuses, c'est-à-dire, qui ne forment pas de canal fonctionnel à l'état d'homomères, sont "spécialisées" dans l'hétéromérisation avec d'autres sous-familles de K_v . Par exemple les K_v2 forment des hétérotétramères avec les K_v5 , K_v6 et K_v8 . C'est les différents patterns d'expression qui permettent de déterminer où un hétéromère doit avoir sa fonction.

Les canaux K_{ir} peuvent aussi hétéromériser. Celle-ci advient généralement entre membre de la même sous-famille, par exemple $K_{ir}2.1$ peut s'associer avec les autres membres $K_{ir}2.X$ (Schram et al., 2002). Cependant il a aussi été observé des hétéromères entre $K_{ir}4.1$ et $K_{ir}5.1$ (Hibino et al., 2010).

Il est intéressant de noter que certains hétéromères peuvent être impliqués dans des pathologies comme par exemple les hétéromères de $K_{ir}2.X$ qui sont impliqués dans la maladie d'Andersen (Preisig-Müller et al., 2002). Cependant chez les K_{2P} la caractérisation d'hétéromères reste peu connue.

1.2.4.7.1 Le premier hétéromère TASK-1/TASK-2

Le premier hétéromère de K_{2P} à avoir été caractérisé est l'hétéromère TASK-1/TASK-2 (Czirják and Enyedi, 2002b). Cela a été possible grâce à la différence de sensibilité qu'il possède pour le ruthénium red. Comme attendu, le complexe formé par ces deux sous-unités possède de nouvelles caractéristiques biophysiques. TASK-1 est sensible à l'acidification extracellulaire alors que TASK-2 est sensible à l'alcalinisation extracellulaire. L'hétéromère quant à lui possède une sensibilité au pH intermédiaire.

Un premier exemple de fonction physiologique de ce mécanisme chez les K_{2p} a été trouvé en 2003 (Lauritzen et al., 2003) où l'hétéromère TASK-1/TASK-2 est impliqué dans la mort cellulaire par apoptose des neurones granulaires.

Les cellules du glomus de la carotide produisent un courant ressemblant au courant TASK, qui joue un rôle important dans la régulation de l'excitabilité et l'augmentation induite par l'hypoxie de la respiration. En 2009, Kim et al ont montré que l'hétéromère TASK-1/TASK-3 est l'acteur principal du courant K^+ sensible à l'oxygène des cellules du glomus (Kim et al., 2009).

1.2.4.7.2 THIK-1 et THIK-2

Il existe plusieurs K_{2p} qui ne produisent pas de courant dans les systèmes d'expression hétérologue. Une des raisons principales à cela est qu'ils sont retenus dans le réticulum endoplasmique (Bichet et al., 2015). On pourrait penser que ces canaux silencieux peuvent avoir le même rôle que les K_v silencieux. C'est-à-dire former des hétéromères avec d'autres K_{2p} pour moduler leur fonction. C'est le cas de THIK-2. En effet cette sous-unité, normalement retenue dans le réticulum endoplasmique, peut s'associer à une sous-unité THIK-1. Le canal ainsi formé peut rejoindre la membrane plasmique et avoir un courant mesurable. L'hétéromère présente une conductance intermédiaire par rapport aux homomères (Blin et al., 2014).

1.2.4.7.3 TWIK-1 et TREK-1

L'hétéromère TWIK1/TREK-1 est l'exemple qui illustre la difficulté d'étudier les hétéromères des K_{2p} . En effet dans une étude de 2012, Plant et collaborateurs étudient l'effet de la SUMOylation sur les hétéromères de TASK et montrent que TASK et TWIK n'hétéromérisent pas. Dans cette étude, TWIK-1/TREK-1 est un contrôle négatif (Plant et al., 2012). Deux ans plus tard ce canal est observé dans les astrocytes hippocampaux. Il serait responsable en grande partie du courant de fond K^+ de ces cellules (Hwang et al., 2014). Enfin, il a récemment été montré que la suppression génétique de TREK-1 ou TWIK-1/TREK-1 ne change pas les propriétés électrophysiologiques de base de ces cellules (Du et al., 2016). L'existence de cet hétéromère est donc controversé montrant, en outre, que l'étude des hétéromères des K_{2p} est compliquée à adresser.

1.2.4.7.4 La sous-famille TREK

Lors de ma thèse j'ai étudié l'hétéromérisation chez les membres de la sous-famille TREK. Celle-ci a pu être mise en évidence grâce à la technique de précipitation de molécule unique (Single molecule pull down ou SiMPull) (Jain et al., 2011) et de colocalisation fluorescente à l'échelle de la molécule unique (Ulbrich and Isacoff, 2007). Une fois la formation des hétéromères TREK-1-TREK-2 et TREK-1-TRAAK confirmée, on a pu grâce aux protéines chimères déterminer les caractéristiques biophysiques et des régulations de ces nouveaux canaux. Les résultats de cette étude sont expliqués en détail dans la partie Résultats-Article 2.

I.3 La sous-famille TREK

La sous-famille TREK est de loin la plus étudiée des canaux potassiques à deux domaines pore. Ma thèse porte sur la régulation de ces membres par différents facteurs/protéines partenaires. C'est pour cela que je développerai plus longuement à la description de ces canaux.

Cette sous-famille comporte 3 membres: TREK-1, TREK-2 et TRAAK. TREK-1 pour "Twik RElated K⁺ channel" est le deuxième K_{2P} à avoir été cloné (Fink et al., 1996). Ensuite c'est le canal TRAAK pour "Twik Related arachidonic Acid Activated K⁺ channel" qui fut cloné en 1998 (Fink et al., 1998). Enfin il faut attendre les années 2000 pour que le canal TREK-2 soit cloné et caractérisé (Bang et al., 2000). Les canaux TREK-1 et TREK-2 partagent 63% d'identité et 78% d'homologie. Avec le canal TRAAK ils partagent 69% d'homologie.

I.3.1 TREK-1 et TREK-2

Canaux qui donnent leur nom à la sous-famille, ils sont semblables en de nombreux points autant au niveau de leurs régulations que de leurs fonctions.

I.3.1.1 Caractéristiques générales

TREK-1 contrairement aux autres membres de la sous-famille possède des courants rectifiés en condition IsoK (Fink et al., 1996). Sa conductance est de 100pS en IsoK (Patel et al., 1998). Dans des conditions physiologiques les courbes I/V des enregistrements unitaires montrent une diminution de la conductance pour les potentiels de membranes négatifs. Cette rectification est dépendante du Mg²⁺ extracellulaire et disparaît pour les potentiels de membrane positifs (Kim et al., 2001a).

L'activation de TREK-1 est dépendante du temps. Durant la dépolarisation on peut observer une composante instantanée du courant sortant, suivie par une importante composante voltage-dépendante qui augmente en 4 à 6ms. Durant la repolarisation on observe aussi une composante instantanée suivie par une désactivation comprise entre 4 et 6 ms (Maingret et al., 2002). La P₀ d'un canal unitaire TREK-1 augmente rapidement durant la dépolarisation: cela est surtout dû à une diminution du temps compris entre des "burst" d'ouverture du canal (Xian Tao Li et al., 2006). Des expériences de troncation du domaine C-terminal ont permis de mettre en évidence l'implication de ce domaine dans la voltage dépendance du canal (Maingret et al., 2002).

Il a été observé que TREK-1 peut passer d'un courant voltage dépendant à un courant de fuite cela dans diverses conditions. La première description de ce changement a été réalisé en 2001, Bockenhauer et collaborateurs ont montré que la déphosphorylation de la sérine 343 (domaine C-terminal) permet de passer d'un canal sensible au voltage à un canal de fuite (Bockenhauer et al., 2001). D'autres types de mécanismes permettent de passer d'un type de courant à l'autre comme lorsque le canal est activé par l'acidification intracellulaire, ou que le senseur aux protons E306 est muté en alanine (mimant une protonation) ou

encore quand le canal est stimulé par le PIP_2 (Bockenhauer et al., 2001; Chemin et al., 2005a; Honoré et al., 2002; Maingret et al., 2002). Ce changement peut être expliqué par le fait que toutes ces modifications augmentent la probabilité d'ouverture du canal. Puisque la P_0 ne peut pas dépasser 1, toutes les modifications qui augmentent cette caractéristique laisse "moins de place" pour l'activation voltage dépendante (Renigunta et al., 2015).

TREK-2 possède un courant instantané qui ne s'inactive pas (Bang et al., 2000). En condition de potassium symétrique les courant TREK-2 montrent une rectification sortante due à une augmentation de la P_0 avec la dépolarisation (Bang et al., 2000; Lesage et al., 2000b).

1.3.1.2 Variants d'épissage.

TREK-1 et TREK-2 possèdent la même organisation génique de 7 exons (Lesage et al., 2000b). Tout d'abord, ces canaux peuvent avoir des variants d'épissage au niveau de leur domaine N-terminal (Exon1). Pour TREK-1 cela produit deux isoformes de 411 et 426 résidus (Bockenhauer et al., 2001; Fink et al., 1996); ceux-ci n'ont pas de différences au niveau de leurs caractéristiques biophysiques et de leurs régulations (Xian Tao Li et al., 2006). On peut noter que ces variants sont exprimés dans le myomètre chez la femme enceinte ou non (Wu et al., 2012b).

Pour TREK-2 il existe trois variants d'épissage sur le premier exon: hTREK-2a, hTREK-2b et hTREK-2c. Ils possèdent les mêmes caractéristiques mais n'ont pas le même profil d'expression. TREK-2a est présent dans le cerveau, le pancréas et les reins (Lesage et al., 2000b). TREK-2b est exprimé dans le tubule proximal du rein et le pancréas (Gu et al., 2002). TREK-2c est surtout retrouvé dans le cerveau (Gu et al., 2002).

Autre que les variants en N-terminal, on peut noter la présence du variant de TREK-1 appelé TREK-1 Δ Ex4 qui ne possède que 141 acides aminés (Veale et al., 2010). Il agit comme un dominant négatif qui retient le canal TREK-1 au niveau du réticulum endoplasmique. Ce variant aurait un rôle pendant l'accouchement où il diminuerait l'activité de TREK-1 pour permettre celui-ci (Cowles et al., 2015a).

1.3.1.3 Variation du site de traduction

La séquence traduite pour l'isoforme normale de TREK-1 a une séquence Kozak faible. Elle peut être sautée par le ribosome en fonction du contexte. La traduction alternative peut commencer sur un codon AUG présent sur le même cadre de lecture mais en position 57. La protéine ainsi produite est tronqué de ces 56 premiers résidus: Δ 1-56 TREK-1 (Thomas et al., 2008). Cette protéine et la protéine de taille normale ont une expression différente lors du développement du système nerveux du rat. Δ 1-56 TREK-1 induit des courants plus petits et possède une sélectivité moins stricte envers le K^+ , en effet ce canal laisse aussi passer du Na^+ (Thomas et al., 2008).

TREK-2 possède également des variants alternatifs de traduction. Il y a 3 sites d'initiation possibles produisant une version longue, intermédiaire et courte de la protéine.

Contrairement à TREK-1 ces variants n'ont pas de changement de sélectivité. Par contre ils ont des conductances unitaires différentes. La version longue ayant la plus petite conductance (52pS) et la version intermédiaire et courte ayant respectivement une conductance de 185 et 224 pS (Simkin et al., 2008).

1.3.1.4 Distribution

TREK-1 et TREK-2 ont une expression importante durant le développement du cerveau chez la souris (Aller and Wisden, 2008). Dans le système nerveux central chez l'adulte TREK-1 est surtout exprimé dans le cortex, le striatum, l'hypothalamus et les structures corticolimbiques (hippocampe et amygdale) (Fink et al., 1996; Talley et al., 2001). TREK-2 quand à lui est retrouvé dans l'hippocampe, le striatum, le bulbe olfactif et les cellules granulaires du cervelet (Gu et al., 2002; Han et al., 2002; Lesage et al., 2000b; Talley et al., 2001). Ces deux canaux sont aussi retrouvés dans les astrocytes corticaux (Gnatenco et al., 2002; Zhou et al., 2009) (Figure 23).

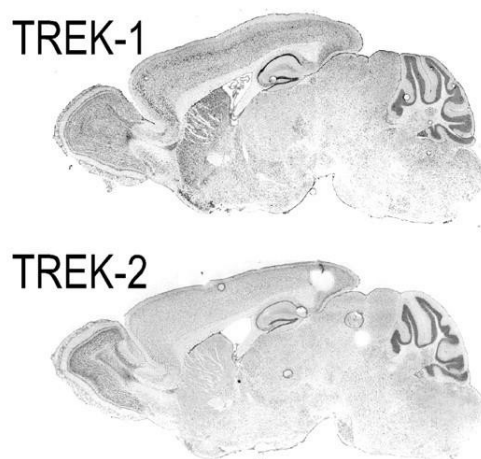


Figure 23: Localisation de TREK-1 et TREK-2 dans le cerveau de souris adultes. Hybridation *in situ* des ARN messagers de TREK-1 et TREK-2 sur une coupe de cerveau de souris. D'après Sandoz et al., 2008.

Au niveau du système nerveux périphérique on retrouve TREK-1 et TREK-2 dans les neurones somatosensoriels où ils jouent un rôle majeur dans la perception sensorielle (Alloui et al., 2006; Descoeur et al., 2011; Noël et al., 2009). On les retrouve aussi dans les neurones de petit et grand diamètre des ganglions de la racine dorsale ainsi que dans les neurones de la glande trigéminal (Kang and Kim, 2006; Medhurst et al., 2001b). TREK-1 est aussi exprimé dans les neurones afférents du nerf vague (Zhao et al., 2010).

TREK-1 et TREK-2 sont également exprimés au niveau périphérique.

TREK-1 est exprimé dans les muscles lisses de plusieurs organes viscéraux comme l'intestin, la vessie le myomètre et plusieurs artères (pulmonaire, basilaire, cutanée) (Noël et al., 2011). Au niveau cardiovasculaire il est exprimé dans les cardiomyocytes atriaux et ventriculaires (Terrenoire et al., 2001a; Xian Tao Li et al., 2006). TREK-1 est exprimé dans les endothéliums des artères mésentériques et des micro vaisseaux cutanés (Blondeau et al., 2007; Garry et al., 2007). On le retrouve aussi dans le poumon, le rein et dans les cellules adrénocorticales

(Enyeart et al., 2002; Inglis et al., 2007). Enfin l'expression de TREK-1 a été corrélée à la prolifération cellulaire dans le cancer de la prostate (Voloshyna et al., 2008).

TREK-2 au niveau périphérique est exprimé dans les testicules, le pancréas, les reins et la rate. En moindre proportion, on le retrouve aussi dans le placenta, les poumon, le foie, le colon, l'intestin grêle et l'atrium du cœur (Bang et al., 2000; Gu et al., 2002; Inglis et al., 2007; Lesage et al., 2000b; Xian Tao Li et al., 2006; Zhang et al., 2008)

1.3.1.5 Rôles dans le système nerveux central

Les K_{2P} et plus précisément les canaux TREK sont des acteurs déterminants dans la configuration et la génération des potentiels d'action des neurones. Ils peuvent moduler le traitement du signal en modifiant le potentiel de membrane de la cellule et ainsi rendre plus ou moins facile l'accès au seuil d'activation du PA du neurone.

1.3.1.5.1 Transmission synaptique

TREK-1 et TREK-2 sont impliqués dans la génération des potentiels postsynaptiques inhibiteurs (PPSI) *via* les récepteurs à l'acide γ aminobutyrique (GABA) de type B (Deng et al., 2009a; Sandoz et al., 2012). TREK-1 est exprimé au niveau des complexes protéiques postsynaptiques (Sandoz et al., 2006, 2008). En 2012 grâce à un outil optogénétique Sandoz *et al* ont montré qu'il peut être activé par les récepteurs $GABA_B$. Exprimé au niveau postsynaptique ce récepteur est connu pour être responsable de potentiels post synaptiques inhibiteurs (PPSI) lents grâce au canal potassique K_{IR3} (Lüscher et al., 1997). Mais en 2005 il a pu être montré que l'activation des récepteurs $GABA_B$ par le baclofène induisait aussi un courant potassique inconnu (Koyrakh et al., 2005) (Figure 24 A et B).. Finalement en 2012 il est apparu que TREK-1 est responsable de ce courant (Sandoz et al., 2012)(Figure 24C). Cette étude suggère fortement que ce canal est impliqué dans la génération des PPSI lents dans l'hippocampe.

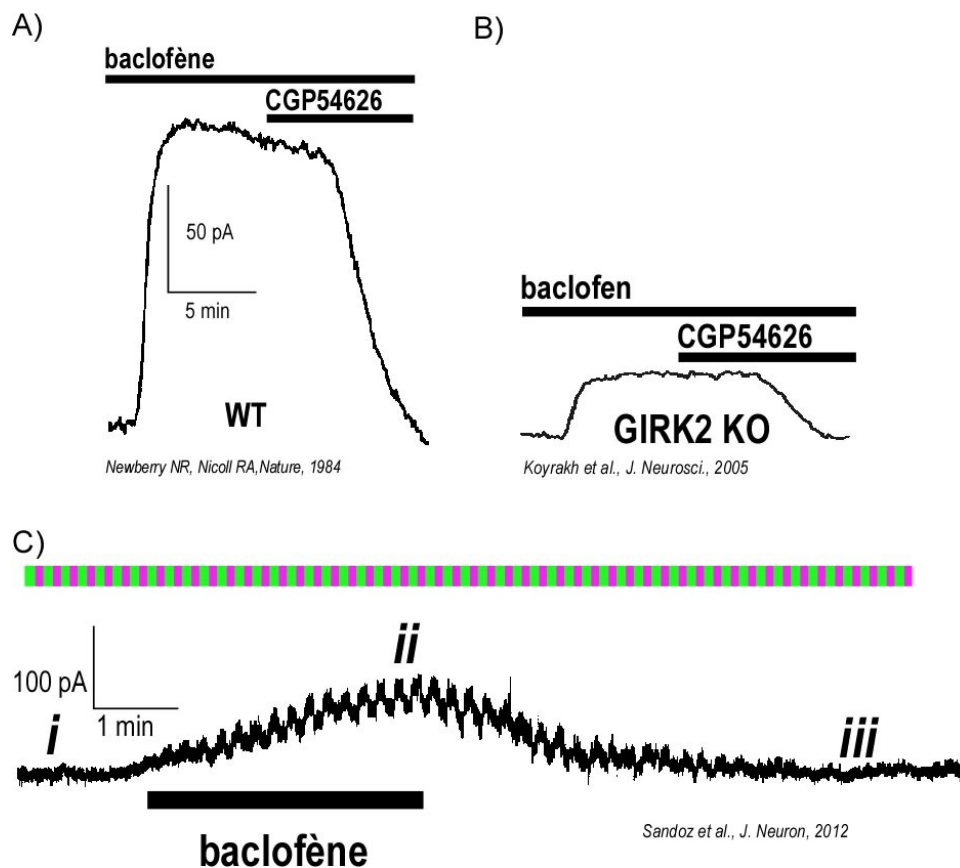


Figure 24: TREK-1 est responsable du courant inconnu activé par le baclofène dans les souris GIRK2/3 KO. (A) L'application de baclofène permet d'activer un courant sortant dans les neurones de CA1 de souris sauvages. Modifié à partir de Newberry and Nicoll, 1984 (B) Courant activé par le baclofène dans les neurones du CA1 de souris GIRK2/3 KO. Modifié à partir de Koyrakh et al., 2005. (C) Courant induit par le baclofène dans les neurones de souris du CA1 en présence de la sous-unité TREK-1-PCS. L'application de baclofène permet d'activer un courant sensible à la lumière correspondant au courant TREK-1. Modifié à partir de Sandoz et al., 2012.

TREK-2 peut aussi être modulé par les récepteur GABA_B dans le cortex entorhinal *via* la voie de signalisation dépendante de la PKA. L'activation du canal permettant d'hyperpolariser les cellules et de diminuer leur activité. Ce mécanisme étant impliqué dans la l'apprentissage spatial (Deng et al., 2009a).

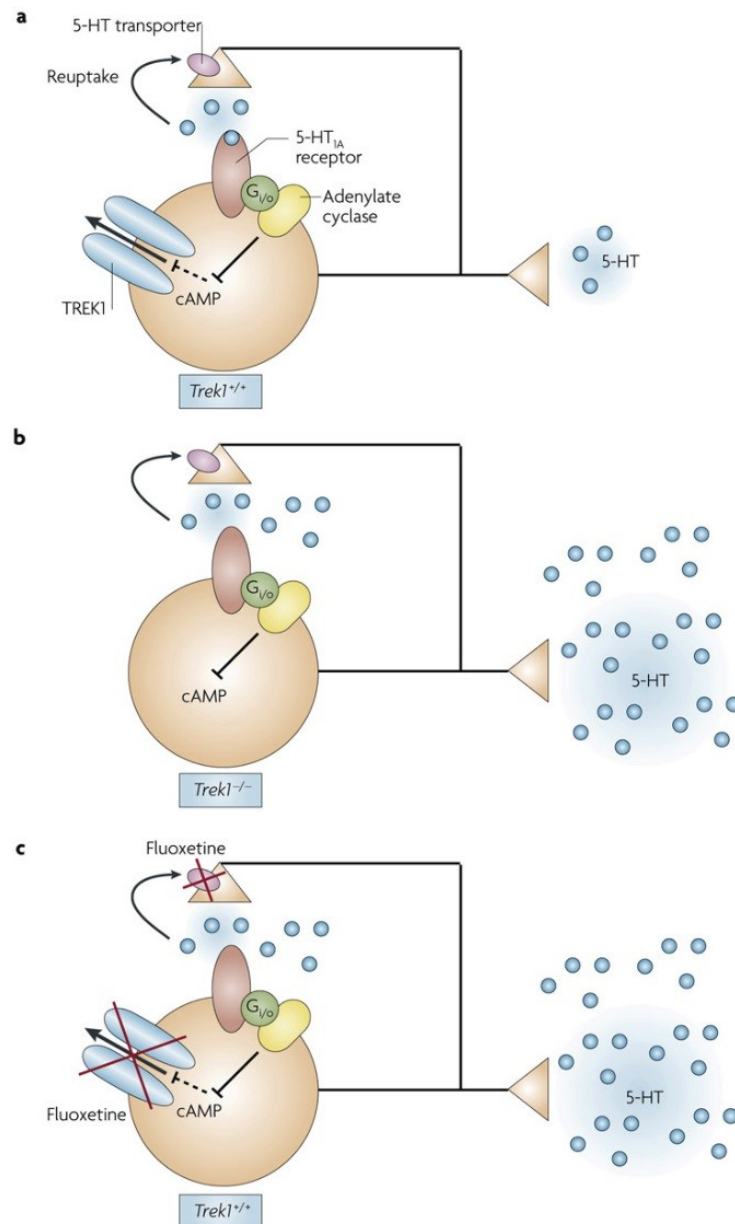
1.3.1.5.2 Dépression

La dépression est un désordre psychiatrique très complexe et polygénique. C'est une maladie très hétérogène et tous les patients ne répondent pas de la même manière aux traitements. L'implication de TREK-1 dans cette pathologie a été mise en évidence en 2006 grâce aux souris TREK-1^{-/-} (Heurteaux et al., 2006). D'autres études ont pu mettre en évidence l'implication de variants humains de TREK-1 dans la réponse aux traitements antidépresseurs (Liou et al., 2009; Perlis et al., 2008). Ces résultats laissent penser que TREK-1 joue un rôle clef dans le traitement de cette maladie.

L'implication de TREK-1 dans la dépression a été mise en évidence en réalisant des tests comportementaux chez les souris KO. (Heurteaux et al., 2006). Il est apparu que les souris

KO ont le même phénotype de résistance à la dépression que les souris traitées avec des antidépresseurs comme la fluoxétine ou la paroxétine. TREK-1 est exprimé dans les neurones 5-hydroxytryptaminergiques du noyau dorsal du raphé (DRN). Chez la souris KO ces neurones ont une activité plus importante induisant ainsi un relargage important de sérotonine (5-HT) au niveau des structures cibles (ex: hippocampe) du DRN. Les souris KO sont insensibles aux inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (SSRIs), laissant penser que TREK-1 est impliqué dans l'effet thérapeutique des SSRIs. L'implication de TREK-1 dans la dépression est donc fortement liée à la 5-HT et le rétrocontrôle négatif que celui-ci induit sur les neurones 5-hydroxytryptaminergiques. Un modèle a été proposé pour expliquer ce mécanisme (Figure 25).

Le relargage de la 5-HT au niveau des neurones 5-hydroxytryptaminergiques active les récepteurs 5-HT_{1A}. Cela va induire une inhibition de la production de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), celle-ci augmentant l'activité de TREK-1. L'augmentation de l'activité du canal va diminuer l'excitabilité du neurone et diminuer le relargage de la 5-HT. Dans le cas de la souris KO ou des antidépresseurs (SSRIs, fluoxétine ...) le canal n'est plus capable de diminuer l'activité des neurones 5-hydroxytryptaminergiques; il en résulte une augmentation globale du relargage de 5-HT par le DRN car le rétrocontrôle négatif n'est plus présent.



Nature Reviews | Neuroscience

Figure 25: Schéma de l'implication de TREK-1 dans la réponse aux antidépresseurs. (A) La stimulation du récepteur de la sérotonine (5-HT_{1A}) active TREK-1 par une diminution de sa phosphorylation. L'ouverture de TREK-1 entraîne une hyperpolarisation responsable de la diminution de la libération de sérotonine par les neurones du Raphé. (B) Dans les neurones des souris TREK-1^{-/-}, la perte de TREK-1 entrainerait une augmentation de la libération de sérotonine. (C) Un moyen d'augmenter la libération de sérotonine pour traiter la dépression consiste à administrer de la fluoxétine. Cette molécule agit sur la recapture de la sérotonine au niveau du neurone pré-synaptique et sur l'inhibition de TREK-1 au niveau du neurone post-synaptique. D'après Honoré et al., 2007.

1.3.1.5.3 Neuroprotection

Grace à la souris KO il a pu être mis en évidence que TREK-1 est impliqué dans la neuroprotection lors des ischémies (Heurteaux et al., 2004). En effet les souris KO sont plus sensibles aux ischémies que les souris sauvages. Cet effet vient de la sensibilité du canal aux

lysophospholipides (l'acide arachidonique) et à l'acide gras polyinsaturé linoléate (Heurteaux et al., 2004).

Durant une ischémie cérébrale, de l'acide arachidonique est relargué, le pH intracellulaire diminue et les neurones gonflent. Ces altérations contribuent à activer TREK-1. L'hyperpolarisation qui en résulte permet au niveau post-synaptique de limiter l'ouverture des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants. Au niveau présynaptique cela permet d'augmenter le blocage des récepteurs au N-Methyl D-Aspartate (NMDA) par le Mg^{2+} . Ces mécanismes permettent de protéger les neurones d'une suractivation par le glutamate (Franks and Honoré, 2004).

1.3.1.5.4 Dans l'anesthésie

La contribution importante des $\text{K}_{2\text{P}}$ dans le maintien du potentiel de repos et leur sensibilité à certains anesthésiques suggèrent qu'ils jouent un rôle dans l'anesthésie des mammifères et par extension dans les mécanismes de l'éveil et leurs altérations.

Les souris TREK $1^{-/-}$ montrent une diminution de leur sensibilité aux anesthésiques volatiles comme le chloroforme, l'halothane, le sevoflurane et le desflurane (Franks and Honoré, 2004). En effet une concentration qui permet d'endormir 100% d'une population sauvage n'a pas d'effet sur les souris KO (Heurteaux et al., 2004) (Figure 26). Il est important de noter que la sensibilité des souris à ces anesthésiques peut dépendre de l'âge. Cette différence est sûrement due aux différents patterns d'expression des $\text{K}_{2\text{P}}$ lors du développement (Aller and Wisden, 2008; Bando et al., 2014).

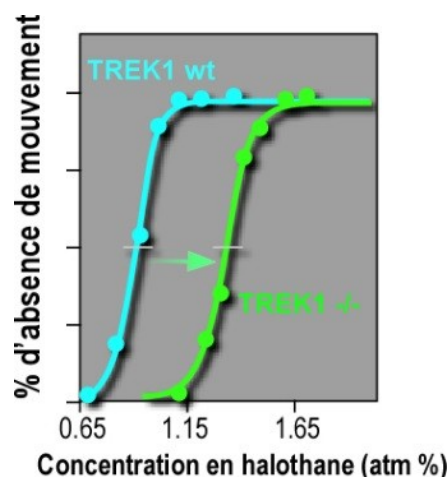


Figure 26: Les souris TREK- $1^{-/-}$ sont moins sensibles à l'halothane. Une concentration d'halothane permettant d'endormir 100% des souris sauvages n'a pas d'effet sur les souris TREK- $1^{-/-}$. Modifié à partir d'Heurteaux et al., 2004.

1.3.1.5.5 Barrière hémato-encéphalique, blood-brain barrier (BBB)

TREK-1 joue un rôle dans le trafic des leucocytes à travers la barrière hémato-encéphalique (BBB) (Bittner et al., 2013). TREK-1 est exprimé dans les cellules endothéliales du cerveau et non dans les cellules immunitaires. La souris TREK- $1^{-/-}$ montre une augmentation de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC alors que la réponse immunitaire périphérique reste comparable à celle de la souris sauvage (Bittner et al., 2013).

1.3.1.6 Rôles dans le système nerveux périphérique

1.3.1.6.1 Douleur

La douleur est un mécanisme de défense essentiel. La sensation de douleur permet de nous alerter de blessures réelles ou imminentes permettant ainsi de déclencher une réponse adaptée. La sensation de douleur est transmise des tissus périphériques au système nerveux central. Les *stimuli* qui causent un signal douloureux sont nombreux (chaleur, pression, agents chimiques et dommages tissulaires), ceux-ci sont détectés par des canaux ioniques et des récepteurs présents dans les terminaux nocicepteurs périphériques. Le signal est ensuite transmis au SNC *via* les neurones des ganglions de la racine dorsale ou les ganglions trigéminaux. Les canaux potassiques jouent un rôle important dans l'excitabilité neuronal et dans la génération de ce signal.

1.3.1.6.1.1 TREK-1

TREK-1 est impliqué dans les sensations douloureuses polymodales. L'implication de TREK-1 dans la douleur a surtout été mise en évidence grâce à la souris KO TREK-1^{-/-} (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). Les souris KO sont plus sensibles que les souris sauvages aux sensations douloureuses. De plus des expériences ont montré que les fibres-C de la souris KO sont plus sensibles à la chaleur que celles des souris sauvages.

De manière similaire à la douleur thermique les souris KO sont plus sensibles aux *stimuli* mécaniques (Alloui et al., 2006; Noël et al., 2009). TREK-1 est impliqué dans la sensibilisation périphérique des nocicepteurs durant l'inflammation (Alloui et al., 2006).

Ces observations font de TREK-1 un canal clef dans la perception de la douleur et font de lui une cible attractive pour le développement de molécule anesthésique. On peut noter qu'une étude a mis en évidence que TREK-1 contribue à l'anesthésie induite par la morphine (Devilliers et al., 2013).

1.3.1.6.1.2 TREK-2

TREK-2 est un acteur clef dans la génération du potentiel de membrane dans les DRG (Acosta et al., 2014). Dans des conditions physiologiques, TREK-2 contribue à 69% des courant K⁺ dans les neurones des DRG (Kang and Kim, 2006). Acosta et al. ont montré en 2014 que TREK-2 est exprimé dans les fibres-C liant la selectin B4 (selectin B4 (IB4)-binding) et joue un rôle dans le contrôle de la douleur spontanée (Acosta et al., 2014). De plus il est impliqué dans la perception de la douleur mécanique et osmotique après une sensibilisation due à la prostaglandine E2 (PGE₂) (Pereira et al., 2014). Enfin il est impliqué dans l'hypersensibilité au froid chez les personnes traitées pour le cancer par oxaliplatine (Pereira et al., 2014).

1.3.1.7 Rôles au niveau périphérique

1.3.1.7.1 Dans le système cardiovasculaire

1.3.1.7.1.1 Le cœur

Dans les myocytes atriaux et ventriculaires les courants potassiques de fond jouent un rôle critique dans le maintien du potentiel de membrane et dans la régulation de la durée des potentiels d'action. Ce courant de fond est surtout porté par des canaux à rectification entrante mais certains K_{2P} comme TREK sont aussi exprimés dans ces cellules et jouent un rôle dans ce courant.

I_{KAA} est un courant sensible à l'acide arachidonique et à l'étirement, qui fut décrit dans les années 90 dans les cellules atriales et ventriculaires de rat (Hu and Sachs, 1997; Kim, 1992). Il a été montré que ce courant peut être activé par les anesthésiques volatiles. Il est aussi inhibé par des analogues perméables de l'AMPC et par l'activation de récepteurs β -adrénergiques (Terrenoire et al., 2001b). Tous ces résultats sont cohérents avec les caractéristiques de TREK-1. Ce canal est donc sûrement responsable du courant I_{KAA} (Terrenoire et al., 2001b). L'expression de TREK-1 dans les myocytes atriaux et sa sensibilité à l'étirement peuvent l'impliquer dans la régulation de la sécrétion de peptide natriurétique. Mécanisme dépendant de l'étirement membranaire (Ruskoaho, 1992).

Un courant de fond correspondant à TREK-1 est aussi présent dans les myocytes ventriculaires. TREK-1 a un profil d'expression hétérogène dans le ventricule. Il est plus exprimé dans l'endocarde plutôt que dans l'épicarde (Tan et al., 2004). De plus il a été observé que le chloroforme induit un plus grand courant potassique dans les cellules de l'endocarde (Tan et al., 2004). Cette différence d'expression de TREK-1 peut être corrélée avec les niveaux de variations des rétrocontrôles électromécaniques retrouvés dans les régions du mur ventriculaire (Kelly et al., 2006).

1.3.1.7.1.2 Les vaisseaux

TREK-1 influence la cascade de signalisation entre l'activation des récepteurs et la production du NO. TREK-1 contribue à la synthèse du NO en maintenant le potentiel de membrane des cellules endothéliales à des valeurs hyperpolarisées favorisant ainsi l'entrée de Ca^{2+} (Goonetilleke and Quayle, 2012).

1.3.1.7.2 Le myomètre

L'expression de TREK-1 dans le myomètre est augmentée durant la grossesse et diminue lors de l'accouchement. Le rôle du canal étant de maintenir quiescent l'utérus en hyperpolarisant les cellules des muscles lisses (Buxton et al., 2011; Tichenor et al., 2005). Il est intéressant de noter que les variants de transcription de TREK-1 peuvent jouer un rôle pathologique dans l'accouchement avant terme (Cowles et al., 2015a).

1.3.1.7.3 Les cancers

Depuis quelques années l'implication de TREK-1 et TREK-2 a été observée dans plusieurs types de cancers. En effet en 2013 une méta-analyse a pu tester l'expression de tous les K_{2P} (dont TREK-1 et TREK-2) dans 20 cancers différents. Tout d'abord on peut noter que l'expression de TRAAK ne change dans aucuns cancers. TREK-1 est dans les 5% de gènes les plus exprimés dans le cancer du poumon et dans les 5% sous-exprimés dans le cancer du sein, gastro-intestinal, de la tête et du cou. Pour TREK-2 il est dans les 1% de gènes sous-exprimés dans les cancers colorectaux et du rein. Dans les cancers du sein et du cerveau il est dans les 5% de gènes sous-exprimés (Williams et al., 2013).

Dans les cancers de la prostate il a pu être observé une surexpression du canal TREK-1 qui induit une augmentation de la prolifération cellulaire. Cette division cellulaire peut être inhibée par des bloqueurs de TREK-1 ou grâce à des ARNi. Malgré le fait que le mécanisme ne soit pas connu cela fait de TREK-1 une cible potentielle pour de nouveaux traitements (Voloshyna et al., 2008). Récemment il a été déterminé que TREK-1 peut être un biomarqueur de survie dans le cancer de la prostate. Dans la même étude l'inhibition de TREK-1 permet de diminuer la prolifération cellulaire *in vivo* et *in vitro* en bloquant les cellules en phase G1/S (Zhang et al., 2015a).

Enfin, il a pu être observé que TREK-1 et TREK-2 sont exprimés dans le cancer ovarien. La modulation de ces canaux peut modifier la prolifération des cellules cancéreuses (Innamaa et al., 2013). TREK-2 est aussi présent dans les cellules de cancer de la vessie (253J) où il jouerait un rôle partiel dans le cycle cellulaire (Park et al., 2013).

La prolifération cellulaire

On vient de voir que TREK-1 et TREK-2 sont impliqués dans plusieurs cancers. Bien que les mécanismes exacts mis en jeu ne soient pas bien connus, il apparait clairement qu'ils sont impliqués dans la prolifération. Peu d'études analysent l'implication de ces canaux dans ce mécanisme. Très récemment une étude apporte un début de réponse en observant que la surexpression de TREK-1 dans des cellules CHO inhibe leur prolifération. Cela *via* l'activité de la PKA et la voie de signalisation p38/MAPK (Zhang et al., 2016).

1.3.1.8 Régulation

Comme nous venons de le voir les canaux TREK-1 et TREK-2 ont de nombreux rôles physiologiques et sont impliqués dans plusieurs pathologies. Tout cela provient de leurs caractéristiques biophysiques qui sont très finement régulées par une multitude de *stimuli*. Ceux-ci peuvent être physico/chimiques (mécanosensibilité, thermosensibilité, sensibilité au pH intra- et extracellulaire), physiologiques (*via* des cascades de signalisation impliquant entre autre les protéines G ou l'interaction avec des protéines partenaires) et pharmacologiques. Pour ce dernier type de *stimuli*, on peut remarquer que TREK-1 est impliqué dans plusieurs mécanismes physiopathologiques (dépression, douleur, ...) faisant

de lui une cible potentielle pour des traitements. De plus en plus de molécules sont donc testées pour trouver des ligands spécifiques de ce canal.

1.3.1.8.1 Mécanosensibilité

1.3.1.8.1.1 Généralités

TREK-1 et TREK-2 sont des canaux mécanosensibles dans le sens où leur activité peut être modifiée par des changements de courbure de la membrane. Celle-ci peut être induite par l'étirement (stress de la membrane) ou une pression négative (-36mmHg) (Bang et al., 2000; Honoré et al., 2006; Maingret et al., 1999a; Patel et al., 1998). Les courants sont générés de manière progressive et ne s'inactivent pas. Il a été proposé que les courbures négatives de la membrane puissent activer ces canaux. En effet le trinitrophénol ou acide picrique peut s'insérer dans la partie extérieure de la membrane et induire une courbure négative similaire à une pression négative. Il s'ensuit une activation de TREK-1 et TREK-2. Inversement, des molécules comme la chlorpromazine qui s'insèrent dans la partie interne de la membrane induisant une courbure concave de celle-ci, inhibe TREK-1 (Patel et al., 1998, 2001). De manière intéressante la mécano-sensibilité de ces canaux est préservée lors d'expériences en Inside-out avec un patch de membrane isolé (Bang et al., 2000; Patel et al., 1998). Cela laisse penser que le mécanisme mis en jeu n'est pas dépendant du cytosquelette mais serait une caractéristique du canal en lui-même.

1.3.1.8.1.2 Mécanismes d'action

Il a été montré que la mécano-sensibilité des canaux TREK-1 et TREK-2 est directe. C'est-à-dire que la force du *stimulus* est directement transmise au canal. Dans le cas de ces canaux cela se fait *via* la membrane lipidique (Brohawn et al., 2014a). On parle de canaux activés par la tension membranaire. La question maintenant est de savoir comment se passe le couplage entre la force et l'activation du canal.

Il faut noter que les canaux TREK possèdent 2 conformations une dite "haute" l'autre dite "basse" (Figure 27). Dans la configuration haute le canal offre au potassium un passage ouvert et direct entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire (Brohawn et al., 2014b). Dans la configuration basse, le passage des ions est bloqué par la chaîne des phospholipides de la membrane plasmique (Brohawn, 2015). La tension membranaire permet de fournir l'énergie nécessaire au canal pour passer d'une configuration à l'autre (Brohawn, 2015).

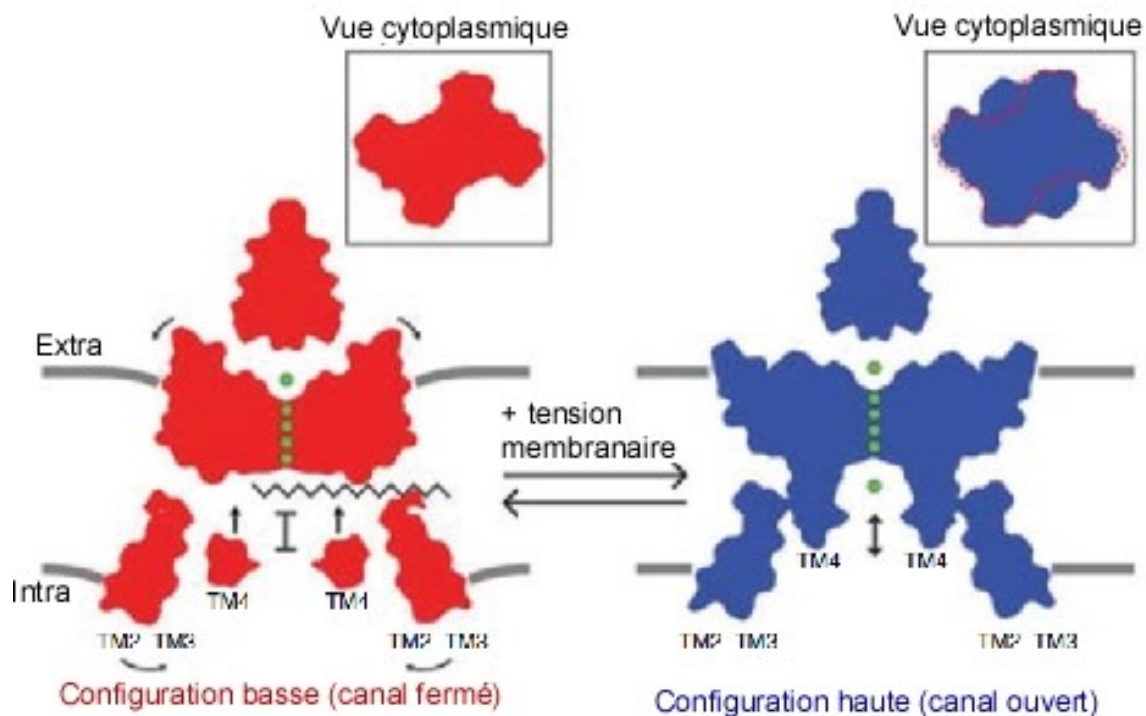


Figure 27: Schéma représentant le mécanisme d'action de la mécano-sensibilité de TREK-1 et TRAAK. La configuration basse (rouge) est un état où le canal est fermé alors que dans la configuration haute (bleu) le canal est ouvert. En configuration basse la chaîne acyle d'un lipide a accès à la cavité centrale et bloque le passage des ions (vert). En configuration haute (bleu) la chaîne lipidique n'a pas accès à la cavité centrale; le passage des ions est alors possible. L'augmentation de l'aire du canal et la réduction de la courbure de la membrane lors d'un étirement créent une différence d'énergie qui permet le passage de la configuration basse à la configuration haute. Modifié à partir de Brohawn et al. 2015.

1.3.1.8.2 Thermo-sensibilité

1.3.1.8.2.1 Généralités

L'augmentation de la température peut activer les canaux TREK-1 et TREK-2 (Kang et al., 2005; Maingret et al., 2000a; Noël et al., 2009). Le courant de base des canaux TREK augmente de 7 à 20 fois entre des températures de 14 à 42°C. Au-delà de 42°C, l'activité du canal diminue progressivement. La température optimale est comprise entre 30 et 42°C (Figure 28 A et B).

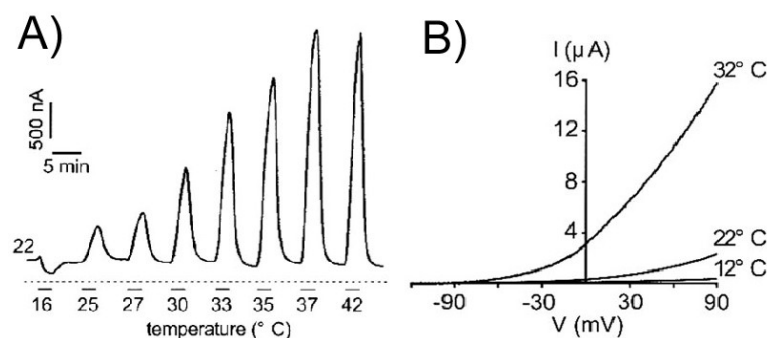


Figure 28: TREK-1 est sensible à la température. (A) Des ovocytes de Xénope exprimant TREK-1 sont soumis à une augmentation graduelle de la température. Les courants sont enregistrés avec un clamp de -20mV. (B) Des rampes de potentiel de 800 ms sont appliquées sur des ovocytes exprimant TREK-1 et enregistrées à partir d'un potentiel de -80 mV à 12, 22 et 32°C. Modifié d'après Maingret et al., 2000..

1.3.1.8.2.2 Mécanismes

Plusieurs parties du canal sont impliquées dans sa sensibilité à la température (Figure 29).

La porte extracellulaire de type-C: Chez les K_{2P} le filtre de sélectivité (Thr-X-Gly-Phe/Tyr-Gly) est une partie clef de la porte extracellulaire. Celle-ci est souvent considérée comme une porte de "Type-C" car sa fonction est similaire à la porte d'inactivation de type-C des canaux potassiques voltage-dépendants (Zilberberg et al., 2001). Durant l'activation des canaux TREK, la porte de Type-C subit des réarrangements structuraux augmentant ainsi sa sélectivité au potassium. En utilisant la sensibilité au potassium comme retour, il a été établi que la porte de type-C est en partie impliquée dans la sensibilité à la température de TREK-1 et TREK-2 (Bagriantsev et al., 2011).

L'hélice du pore est une autre partie clef de la porte extracellulaire, celle-ci permet de maintenir le filtre de sélectivité dans la bonne conformation (Cordero-Morales et al., 2006). La mutation G137I dans cette hélice permet d'annuler les effets de la température sur la membrane (Bagriantsev et al., 2011, 2012).

Le domaine C-terminal: Très vite grâce à des expériences de délétion du domaine C-terminal il a été mis en évidence l'implication de ce domaine dans la sensibilité à la température du canal (Maingret et al., 2000a). Cependant il s'est avéré que la suppression de ce segment avait un effet global sur la structure du canal. Une stratégie a donc été mise en place pour dissocier la fonction du C-terminal tout en le gardant "attaché" à la protéine. Celle-ci consiste à mettre un "lien flexible" entre les deux domaines étudiés (Su et al., 2011). Ainsi le mutant TREK-1 triple glycine ou triple alanine montre une insensibilité à la température (Bagriantsev et al., 2012) permettant de confirmer l'implication de ce domaine. Il a été proposé que l'augmentation de la température permet de faciliter la liaison du C-terminal à la membrane. Ce mécanisme est connu pour augmenter l'activité du canal (Sandoz et al., 2011)

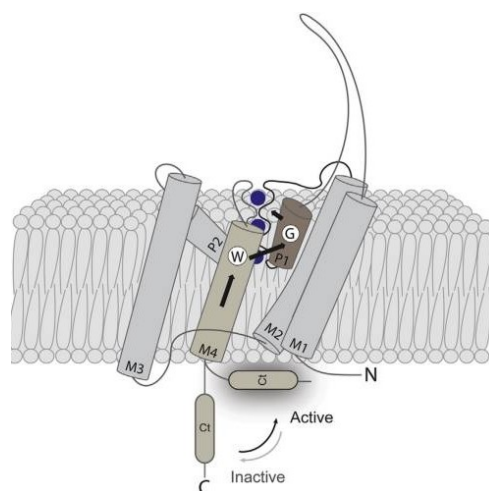


Figure 29: Modèle d'activation de TREK-1 par la température. L'augmentation de température facilite la transition du domaine C-terminal d'une forme inactive à une forme active. Cela permet de stabiliser le canal en conformation ouvert via l'interaction entre le tryptophane 275 et la glycine 137. Modifié d'après Schneider et al., 2014.

1.3.1.8.3 Sensibilité au pH

1.3.1.8.3.1 Acidité intracellulaire

L'augmentation de l'acidité intracellulaire active fortement les courants TREK et les rend insensibles à l'acide arachidonique, l'étirement et la phosphorylation (Honoré et al., 2002). Le senseur de proton intracellulaire est une glutamine en position 306. Muter ce résidu en alanine permet de convertir TREK-1 en un canal potassique constitutivement ouvert. Le résidu E306 est localisé dans une région contenant 5 résidus basiques qui sont connus pour interagir avec la membrane (voir régulation par les acides gras).

1.3.1.8.3.2 Variations du pH extracellulaire

TREK-1 et TREK-2 sont sensibles aux variations de pH extracellulaires. L'acidification inhibe fortement l'activité de TREK-1 avec un pK apparent de 7,4. Tout l'effet du pH sur ce canal peut être observé en une seule unité de pH. Inversement TREK-2 est activé par l'acidification du milieu extracellulaire, cela dans les mêmes ordres de grandeur que TREK-1 (Figure 30 A et B). Le senseur de proton est porté par un seul résidu: une histidine conservée en position 126 pour TREK-1 et en position 151 pour TREK-2 (Figure 30 C). Cette histidine est présente au niveau de la boucle (TMD1P1) extracellulaire précédant la première boucle P. La différence d'effet observée lors de l'acidification sur TREK-1 et TREK-2 provient de plusieurs résidus localisés sur la boucle P2M4 qui lie le second domaine pore au 4^{ème} segment transmembranaire.

Lorsque l'histidine est protonée il va il y avoir répulsion ou attraction entre la boucle TMD1P1 et la boucle P2M4 en fonction de la charge net de cette dernière (Figure 30 D). Ce mécanisme va alors contrôler l'ouverture ou la fermeture de la porte extérieure (Sandoz et al., 2009).

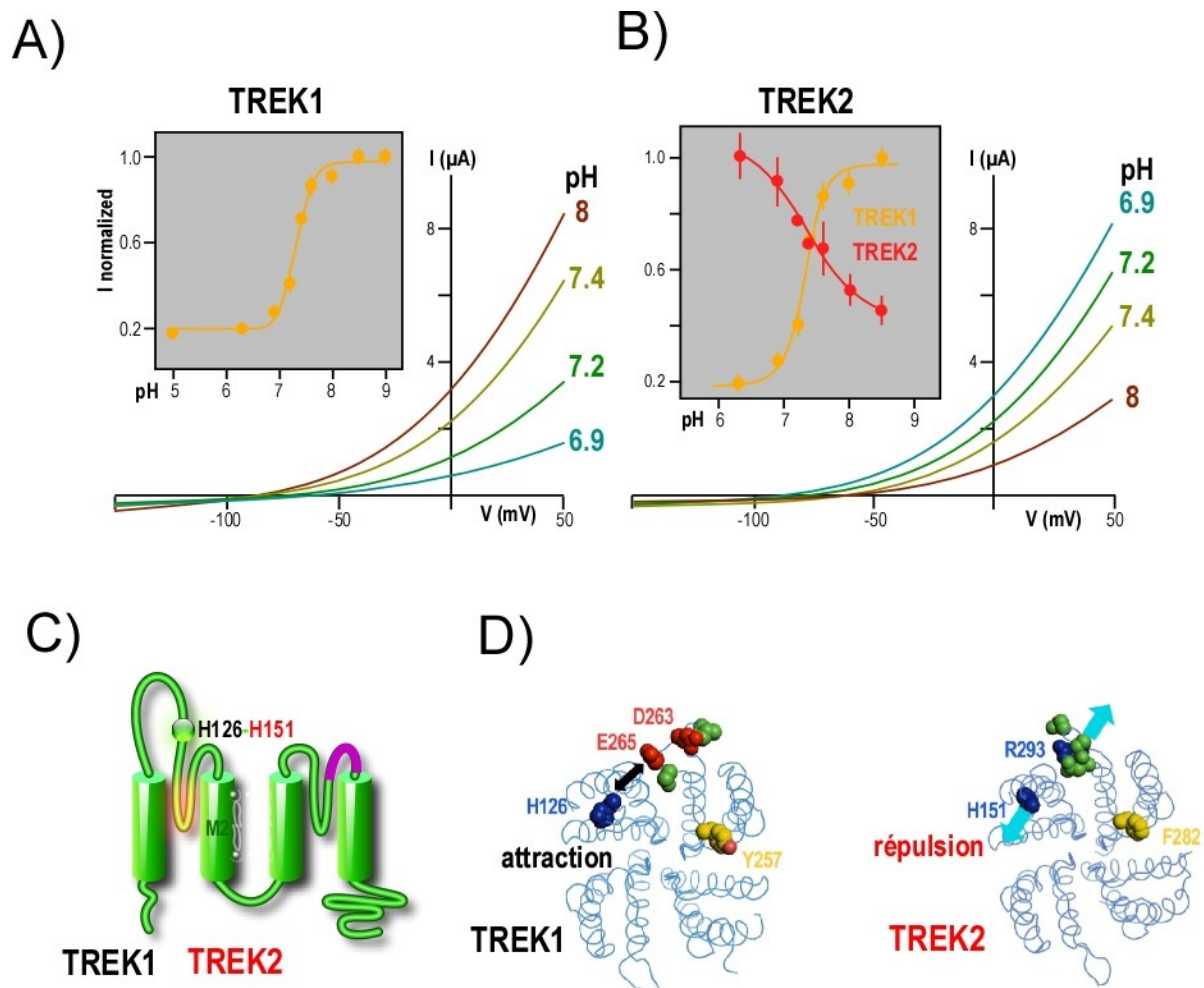


Figure 30: Mécanisme de régulation de TREK-1 et TREK-2 par le pH extracellulaire. (A) TREK-1 est inhibé par l'acidification extracellulaire. Effet du pH extracellulaire sur TREK-1 exprimé dans des ovocytes de xénope. Les courants ont été obtenus grâce à des rampes de voltage (-150 à +50mV en 1s). (B) TREK-2 est activé par l'acidification extracellulaire. Effet du pH extracellulaire sur TREK-2 exprimé dans des ovocytes de xénope. Les courants ont été obtenus grâce à des rampes de voltage (-150 à +50mV en 1s). (C) Représentation schématique d'une sous-unité TREK-1, le senseur de proton H126 pour TREK-1 (noir) ou H151 pour TREK-2 (rouge) est représenté en vert. La boucle P2M4 est représentée en violet. (D) Vue du dessus de la partie extracellulaire des homomères TREK-1 et TREK-2. Les différents résidus impliqués dans la régulation sont représentés par des "boules" de couleurs: bleu pour les résidus chargés positivement, rouge pour les résidus chargés négativement, vert pour les résidus neutres et jaune pour les résidus aromatiques. Modifié à partir de Sandoz et al., 2009.

1.3.1.8.4 Sensibilité aux lipides

1.3.1.8.4.1 PUFA/AA

Les canaux TREK sont activés de manière réversible par les acides gras polyinsaturés (PUFA) dont l'acide arachidonique (AA) (Bang et al., 2000; Patel et al., 1998, 2001). Ces lipides peuvent augmenter le courant TREK de 5 à 20 fois (Figure 31). L'effet des PUFAs est conservé dans les configurations de patch excisé. Ceux sont les 28 à 300 premiers acides aminés du domaine C-terminal qui sont impliqués dans la régulation du canal par les PUFAs (Kim et al., 2001a; Patel et al., 1998).

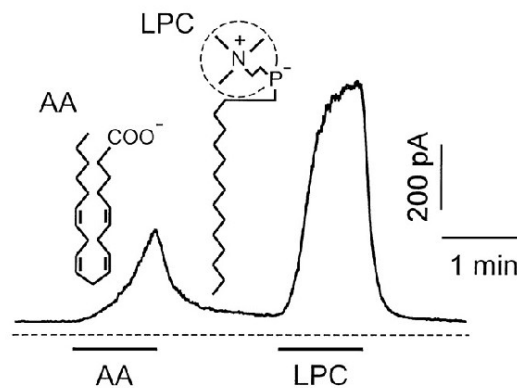


Figure 31: Les canaux TREK-1 sont activés par les lipides. Enregistrement électrophysiologique des cellules COS exprimant TREK-1 en présence soit de $10\ \mu\text{M}$ d'acide arachidonique (AA) soit de $3\ \mu\text{M}$ de lysophosphatidylcholine (LPC). Modifié d'après Maingret et al., 2000.

1.3.1.8.4.2 LPA

Les canaux TREK peuvent être activés par les lysophospholipides (LPA) (Lesage et al., 2000b; Maingret et al., 2000b) ceux-ci ayant une grande chaîne acyle hydrophobe et une large tête polaire (Figure 31). Ceux sont des seconds messagers très abondants dans la cellule avec de multiples effets. Le LPA intracellulaire active TREK-1 par un mécanisme différent de l'AA ou de l'acidité et ne nécessite pas les domaines C-terminal ou N-terminal de régulation (Chemin et al., 2005b). En effet ce serait la boucle intracellulaire entre M2M3 qui serait impliquée.

1.3.1.8.4.3 Phospholipides

Les phospholipides comme le PIP_2 , phosphatidylserine et l'acide phosphatidique sont capables d'activer TREK-1 (Chemin et al., 2005a, 2007a; Lopes et al., 2005). Il a été montré que l'interaction du domaine C-terminal avec la membrane plasmique permet de contrôler l'activité du canal (Sandoz et al., 2011). Cette association implique entre autre l'interaction entre le PIP_2 et le motif polybasique du domaine C-terminal de TREK-1 (Chemin et al., 2005a; Sandoz et al., 2011). Ce mécanisme a été mis en évidence grâce à une technique permettant d'observer la fixation en temps réel du domaine C-terminal à la membrane plasmique dans l'ovocyte de xénope (Sandoz et al., 2011).

En effet, les charges positives portées par le domaine C-terminal sont "attirées" par les charges négatives portées par les têtes du PIP_2 (Figure 32). L'hydrolyse du PIP_2 en diacylglycerol par la PLC activée par les protéines Gq inhibe TREK-1. Cette dernière est due à la déplétion du PIP_2 de la membrane (Chemin et al., 2003) et au décrochage du C-terminal de la membrane plasmique (Sandoz et al., 2011). Ce mécanisme peut expliquer aussi pourquoi la phosphorylation du C-terminal de TREK-1 induit une inhibition du canal. La phosphorylation ajoute une charge négative à ce domaine, perturbant le domaine polybasique.

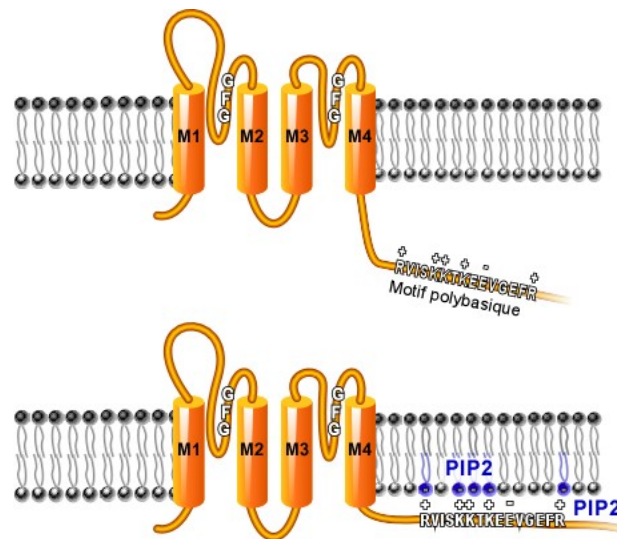


Figure 32: Régulation de TREK-1 et TREK-2 par le PIP₂. En présence de PIP₂, le motif polybasique est attiré à la membrane par les charges négatives du phospholipide. Cela entraîne l'ouverture du canal.

Chemin et collaborateurs ont testé en 2005 plusieurs autres phospholipides dont l'acide phosphatidique (AP). Celui-ci est un composant important de la membrane plasmique des eucaryotes. Il représente entre 1 et 4 % des phospholipides totaux. En plus d'un rôle structurel, il possède également un rôle important dans le métabolisme et la signalisation moléculaire (English, 1996). Par sa petite tête polaire, il facilite les changements de courbure de la membrane lors des événements de fusion tels que le trafic vésiculaire ou l'endocytose. De plus, il est le précurseur d'autres lipides de signalisation comme le diacylglycérol (DAG) et le LPA (Selvy et al., 2011).

Une question peut se poser sur ses phospholipide est de savoir comment ils peuvent cibler spécifiquement un type de canal.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes qui permettent d'expliquer l'action spécifique d'un phospholipide, l'acide phosphatidique (AP). J'ai pu montrer que TREK-1 est régulé spécifiquement dans les neurones d'hippocampe par l'acide phosphatidique *via* une production locale. En effet la phospholipase D2 (PLD2), une des enzymes permettant la synthèse d'AP, *via* son interaction avec le canal, produit un microdomaine riche en AP. Ce microdomaine va pouvoir activer toniquement le canal TREK-1 alors que TRAAK qui n'interagit pas avec ne l'est pas.

1.3.1.8.5 Régulation par les neurotransmetteurs et les récepteurs couplés aux protéines G

Les canaux TREK ont plusieurs résidus au niveau de leur domaine C-terminal qui peuvent être phosphorylés par la protéine kinase A ou C (Bang et al., 2000; Patel et al., 1998). La phosphorylation de ces sites induit une inhibition de ces canaux. Celle-ci advient lors de l'activation de la PKA ou la PKC par des récepteurs couplés aux protéines Gs ou Gq (Chemin et al., 2003; Enyeart et al., 2005; Fink et al., 1998; Murbartián et al., 2005; Patel et al., 1998).

Pour TREK-1 la phosphorylation de la serine 333 par la PKA est requise pour la phosphorylation de la serine 300 par la PKA ou la PKC. Cela suggère qu'il y a une possible interaction entre les sites de phosphorylations et une prédominance du rôle de la PKA dans la régulation de TREK-1 (Murbartián et al., 2005). Le couplage des canaux TREK avec des protéines Gs ou Gq a été montré pour les récepteurs à la sérotonine 5HT4sR, 5HT2bR, le récepteur au PGE2, le récepteur muscarinique M3R, OrexinR, le récepteur à l'angiotensine II et les récepteurs au glutamate mGluR1 et 5 (Figure 33).

Les canaux TREK peuvent être activés par les récepteurs couplés aux protéines Gi (MGLuR2 et MGLuR4). L'activation de tels récepteurs diminue la production de l'AMPC et l'activité de la PKA (Cain et al., 2008; Lesage et al., 2000b). Ce résultat suggère une inhibition tonique des canaux TREK-1 par la PKA. Il a aussi été montré que les récepteurs GABA_B peuvent activer les canaux TREK-1 (Sandoz et al., 2012) et TREK-2 (Deng et al., 2009b; Xiao et al., 2009).

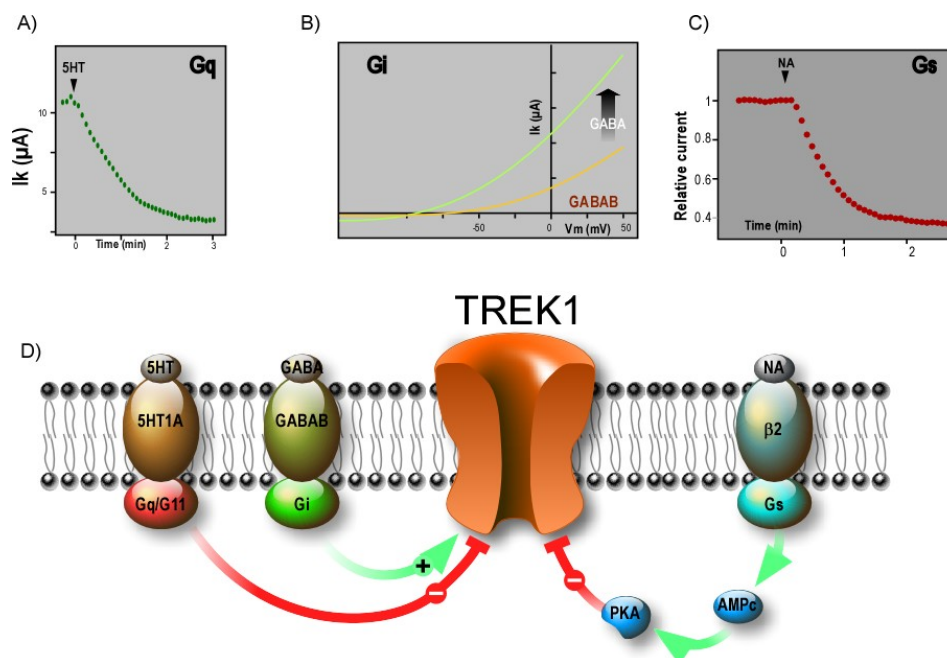


Figure 33: Régulation de TREK-1 par les récepteurs couplés aux protéines G. (A) Inhibition du courant TREK-1 exprimé dans l'ovocyte de xénope par la sérotonine. Modifié à partir de Sandoz et al., 2011 (B) Activation de TREK-1 par le récepteur couplé aux protéines Gi, GABA_B. Modifié à partir de Sandoz et al., 2012. (C) Inhibition du courant TREK-1 par la noradrénaline (NA) via le récepteur β2AR. Courants obtenus dans l'ovocyte de xénope. Modifié à partir de Sandoz et al., 2006. (D) Schéma représentatif de la régulation de TREK-1 par les récepteurs couplés aux protéines G.

1.3.1.8.6 Les partenaires des canaux TREK

1.3.1.8.6.1 AKAP150

C'est une expérience d'immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse qui a permis de mettre en évidence l'interaction de TREK-1 avec l'AKAP150 (A-kinase-anchoring protein) (Sandoz and Lesage, 2008; Sandoz et al., 2006). L'AKAP150 est une protéine d'échafaudage connue pour organiser les complexes de signalisation dans les neurones (Welch et al., 2010), elle interagit entre autre avec la PKA. L'interaction sur TREK-1 se fait au niveau du domaine compris entre V298 et R311. Une fois associé avec l'AKAP150 le canal est totalement activé

et devient insensible aux *stimuli* comme l'acide arachidonique, le pH intracellulaire et l'étirement membranaire. Cependant, il reste sensible à la phosphorylation. L'association de l'AKAP150 avec TREK-1 augmente la cinétique d'inhibition de TREK-1 induite par les récepteurs couplés aux Gs et diminue l'inhibition induite par les récepteurs Gq (Figure 34). On peut noter que cette interaction pourrait être impliquée dans l'apprentissage spatial (Deng et al., 2009b).

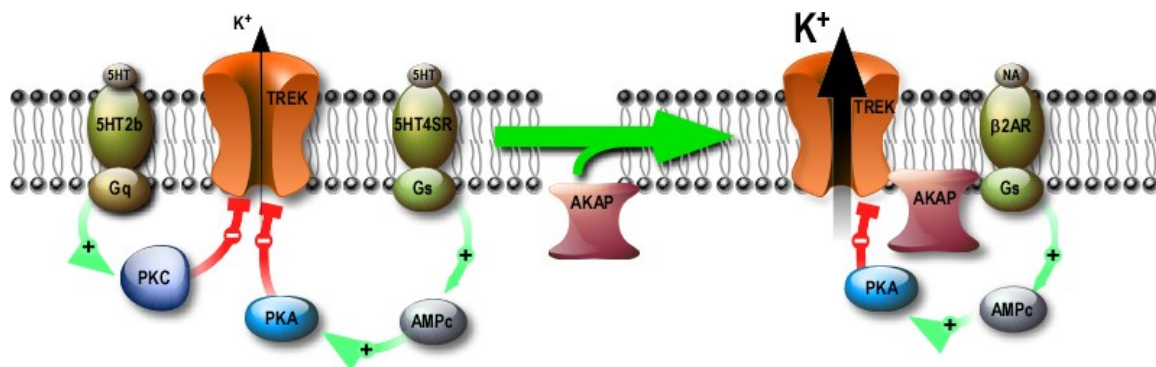


Figure 34: Régulation de TREK-1 par l'AKAP150. L'AKAP150 active TREK-1 en interagissant avec lui au niveau de son domaine C-terminal. De plus, il rend le canal insensible à plusieurs régulations (AA, pH intracellulaire et étirement) mais augmente sa sensibilité aux récepteurs couplés aux protéines Gs.

1.3.1.8.6.2 MAP2

MAP2 pour Microtubule-associated protein 2 est un autre partenaire de TREK-1 et TREK-2 (Sandoz et al., 2008). MAP2 est aussi une protéine d'échafaudage localisée dans les complexes de signalisation dendritiques et plus précisément dans les épines dendritiques. On la retrouve aussi dans les cônes de croissance. L'interaction de MAP2 avec TREK-1 se fait au niveau du domaine C-terminal sur un site compris entre les positions 335 et 360. Ce site contient 4 acides aminés chargés positivement proches les uns des autres (K342, K347, R348, K349) et qui sont essentiels à l'association entre les deux protéines. MAP2 ne modifie pas l'activité de TREK-1 mais permet d'augmenter la densité de canaux à la membrane (Figure 35); la tubuline jouant un rôle important dans cet effet (Sandoz et al., 2008).

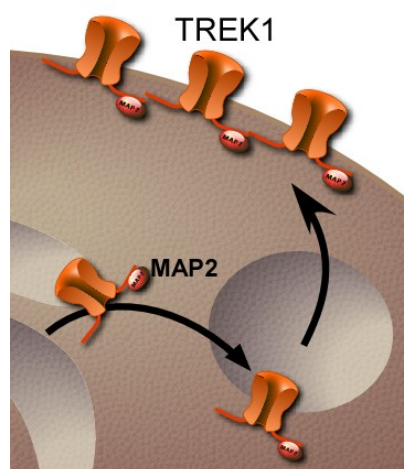


Figure 35: MAP2 permet d'augmenter la densité de canaux TREK-1 à la membrane en s'associant à lui au niveau de son domaine C-terminal.

Enfin on peut noter que l'AKAP150 et MAP2 peuvent fixer en même temps TREK-1, plaçant ainsi le canal au centre d'un complexe protéique comportant des éléments du cytosquelette, des protéines de régulation, des kinases, des canaux ioniques et des récepteurs couplés aux protéines G.

1.3.1.8.6.3 COP1

C'est la sous-unité β -COP1 du complexe COP1 (coatamerprotein complex 1) qui peut interagir avec TREK-1 au niveau de son N-terminal (Kim et al., 2010). Pour l'instant aucune expérience ne prouve l'interaction de β -COP1 avec TREK-2. Le complexe COP1 est impliqué dans le "manteau" des vésicules provenant de l'appareil de Golgi et permet d'induire le transport antéro- et rétrograde des protéines à la membrane. TREK-1 et β -COP1 colocalisent à la membrane. L'expression de β -COP1 augmente l'expression à la membrane de TREK-1 et par conséquent la densité de courant (Kim et al., 2010).

1.3.1.8.6.4 Récepteur neurotensine 3 (NTSR3)

NTSR3 ou encore gp95/sortilin est un autre partenaire dans le trafic de TREK-1 (Mazella et al., 2010). NTSR3/sortilin est essentiellement localisé dans l'appareil de Golgi où il est impliqué dans le trafic intracellulaire. NTSR3/sortilin interagit directement avec TREK-1 au niveau du réseau trans-golgien. Cette interaction augmente l'expression de TREK-1 à la membrane. La régulation de TREK-1 par NTSR3/sortilin est bidirectionnelle. En effet, une maturation post-traductionnelle permet de cliver le domaine N-ter du récepteur. Le peptide ainsi libéré peut lier le complexe TREK-1/ NTSR3 et forcer son endocytose (Mazella et al., 2010). C'est à partir de ce peptide que fut développé la Spadin, un inhibiteur de TREK-1.

1.3.1.8.6.5 Avec des enzymes

Comme expliqué précédemment j'ai étudié lors de ma thèse la régulation de TREK-1 par l'acide phosphatidique. Cette régulation spécifique est due à l'interaction entre le canal et l'enzyme PLD2. Cette étude a montré qu'un K_{2p} peut avoir des enzymes comme protéines partenaires.

1.3.1.8.7 Pharmacologie

1.3.1.8.7.1 Molécules impliquées

TREK-1 et TREK-2 sont insensibles aux bloqueurs classiques des canaux potassiques tels que le TEA, 4-AP, la quinidine ou encore le Cs^+ . Ils sont seulement inhibés partiellement par le Ba^{2+} . Ils sont tous les deux activés par des concentrations cliniques des anesthésiques volatiles: isoflurane, halothane et chloroforme (Patel et al., 1999). Cela a été confirmé chez la souris TREK-1^{-/-} qui présente une baisse de sensibilité à ces mêmes molécules (Heurteaux et al., 2004). TREK-1 peut être activé par des gaz comme le xénon, le cyclopropane et le monoxyde d'azote (Gruss et al., 2004). Par contre il est inhibé par des anesthésiques locaux comme le bupivacaïne et la lidocaïne (Nayak et al., 2009; Punke et al., 2003). Le riluzole, une

molécule neuroprotective utilisée pour protéger les motoneurones lors de la sclérose latérale amyotrophique, peut activer TREK-1 (Duprat et al., 2000). TREK-1 et TREK-2 sont aussi la cible de plusieurs antidépresseurs comme la fluoxétine (Sandoz et al., 2011) et la paroxétine (Thümmeler et al., 2007). Dans les antidépresseurs on peut noter le développement de la spadin, un petit peptide dérivé de la sortilin qui permet d'inhiber TREK-1 (Devader et al., 2015; Mazella et al., 2010).

Etant donné l'importance physiologique et pathologique de TREK-1, des "screens" à haut débit ont été réalisés pour développer de nouvelles molécules agissant sur TREK-1. Par exemple l'équipe de Daniel L Minor, Jr a pu tester 106,281 petites molécules et ainsi identifier 2 nouveaux inhibiteurs et 3 activateurs. A partir de là, ils ont pu développer un analogue du dihydroacridine le ML67-33 qui peut activer de manière réversible TREK-1 (Bagriantsev et al., 2013).

1.3.1.8.7.2 Mécanismes d'action

Les mécanismes d'actions de ces activateurs/inhibiteurs peuvent prendre plusieurs formes.

L'activation mécanique de TREK-1: Ce mécanisme peut être observé avec des molécules qui modifient la morphologie de la membrane comme par exemple la colchicine et la trunculine 1. Ces molécules modifient le cytosquelette et induisent une déformation de la membrane (Vivier et al., 2016).

Le domaine C-terminal : Ce domaine est la cible de nombreuses régulations de TREK-1; il est donc peu étonnant que certains activateurs aient des sites de liaison sur ce domaine. C'est le cas des anesthésiques volatiles (Bertaccini et al., 2014) ou encore de la fluoxétine (Sandoz et al., 2011).

Les domaines extracellulaires: Les K_{2P} possèdent un important domaine extracellulaire celui-ci peut être la cible de plusieurs agents pharmacologiques comme les esters d'acide caffeic (Danthi et al., 2004). Le ML67-33 augmente le courant TREK-1 en activant la porte du filtre de sélectivité de type C extracellulaire (Bagriantsev et al., 2013).

Actions indirectes: Des molécules peuvent modifier l'activité de protéines qui ont une action sur l'activité de TREK-1. Par exemple, l'activation de la PKA par le riluzole induit l'augmentation des taux de l'AMPC et l'inhibition de TREK-1 (Duprat et al., 2000). De la même façon, j'ai pu montrer lors de ma thèse que l'alcool inhibe TREK-1 *via* l'inhibition de l'activité de la PLD2 (Partie Résultats Article 1).

Les domaines transmembranaires: Les études cristallographiques des K_{2P} ont permis de trouver une "fenêtre" aux niveaux des segments transmembranaires. Celle-ci peut par exemple accueillir le prozac (Dong et al., 2015).

Domaine N terminal: Il a été montré récemment que les fenamates, des activateurs de TREK-1, interagissaient avec le domaine N-terminal du canal (Veale et al., 2014).

I.3.2 TRAAK

I.3.2.1 Caractéristiques générales

Le canal TRAAK ("Twik Related arachidonic Acid Activated K⁺channel") est le premier K_{2P} cloné sensible aux phospholipides PUFAs et à l'étirement (Fink et al., 1998). Il produit un courant bien spécifique qui ne présente pas de seuil d'activation au voltage, qui est indépendant du temps et qui ne s'inactive pas. Sa courbe courant-voltage en IsoK montre une rectification sortante qui suit approximativement l'équation de GHK (Lesage et al., 2000a).

I.3.2.1.1 Isoformes

TRAAK possède deux isoformes, un de 393 acides aminés (TRAAKa) et un de 419 acides aminés (TRAAKb). TRAAKb a les mêmes propriétés biophysiques et pharmacologiques (Ba²⁺, Cs⁺, TEA, 4-AP) que TRAAKa. On peut noter que TRAAKb est produit par un gène de 11 exons alors que TRAAKa comme TREK-1 et TREK-2 est produit par un gène de 7 exons (Ozaita and Vega-Saenz de Miera, 2002).

Comme TREK-1, TRAAK possède une isoforme tronquée appelée TRAAKt. Il fait 67 acides aminés de long et est identique à TRAAK dans ces 63 premiers résidus. Cela comprend le premier segment transmembranaire et une partie de la première boucle P. Ce canal ne possède donc pas de boucle P; il n'est pas attendu qu'il puisse former un canal fonctionnel. De plus contrairement à TREK-1ΔEx4 cette isoforme n'altère pas la fonction de TRAAK sauvage (Fink et al., 1998).

I.3.2.1.2 Distribution

L'expression de TRAAK est réputée pour être essentiellement dans le SNC (Figure 36). Son expression est faible dans l'embryon de souris puis augmente avec la naissance avec un pic à P7 (Aller and Wisden, 2008). Chez l'adulte TRAAK est surtout exprimé dans le cortex, la moelle épinière et la rétine (Fink et al., 1998).

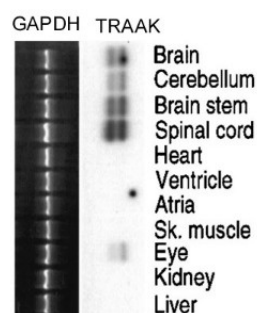


Figure 36: Expression de TRAAK. Northern Blot représentant la distribution tissulaire de TRAAK. Modifié à partir de Fink et al., 1998

Au niveau du système nerveux périphérique l'expression de TRAAK est comparable à celle de TREK-1 et TREK-2. On le retrouve dans les neurones sensoriels (Descœur et al., 2011; Noël et al., 2009) plus précisément dans les neurones à large et petit diamètre des DRG et les ganglions trigéminaux (Kang et al., 2005; Medhurst et al., 2001a; Noël et al., 2009). Enfin TRAAK est aussi exprimé dans les neurones du nerf vague (Zhao et al., 2010) et son courant a été caractérisé dans les ganglions des cervicales supérieures (Cadaveira-Mosquera et al., 2011). Bien que TRAAK soit surtout exprimé au niveau du système nerveux, il a été montré qu'il est présent avec TREK-1 dans les muscles lisses du myomètre (Buxton et al., 2010; Tichenor et al., 2005).

1.3.2.2 Rôles physiologiques

1.3.2.2.1 Douleur

Les canaux TRAAK sont exprimés dans les petits et grands neurones des ganglions de la racine dorsale et dans la glande trigéminal. Ces structures sont liées à la perception de *stimuli* thermiques, mécaniques et chimiques (Marsh et al., 2012; Pollema-Mays et al., 2013). Il a été proposé que TRAAK régule l'excitabilité des neurones sensoriels quand des *stimuli* mécaniques ou thermiques sont appliqués (Figure 37). Des expériences sur les souris KO TRAAK^{-/-} ont permis de confirmer l'implication du canal dans la nociception (Noël et al., 2009).

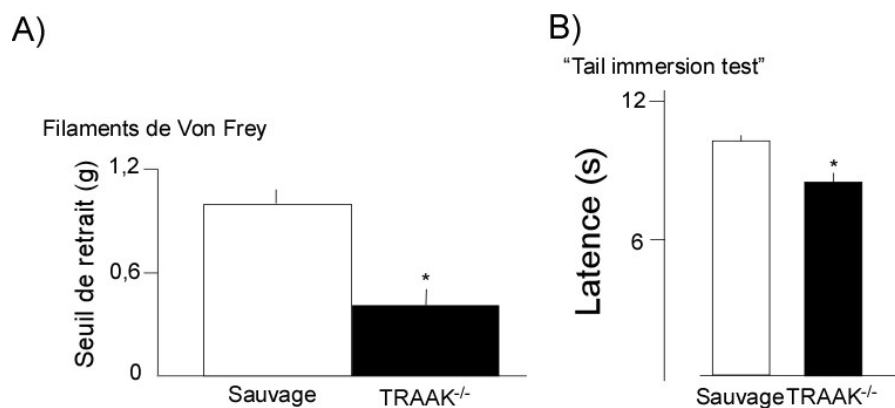


Figure 37: Les souris TRAAK^{-/-} sont plus sensibles aux stimuli mécaniques et thermiques. (A) L'expérience des filaments de Von Frey montre que les souris TRAAK^{-/-} sont plus sensibles aux stimuli mécaniques. Modifié d'après Noël et al., 2009 (B) Expérience de "tail immersion". La queue des souris est mise dans un bain à 46°C, on observe que les souris TRAAK^{-/-} ont un temps de latence moins important que les souris sauvages démontrant une hyperalgésie thermique. Modifié d'après Noël et al., 2009.

En effet, en absence de TRAAK les souris présentent une hypersensibilité aux températures intermédiaires (entre 46 et 50°C). Cette hypersensibilité est retrouvée dans les tests comportementaux et les expériences *ex vivo*. De manière intéressante l'hyperalgésie thermique observée chez les souris KO est de même intensité que l'hyperalgésie induite par l'inflammation ou les neuropathies chez la souris sauvage. (Noël et al., 2009).

Toujours grâce au souris KO TRAAK^{-/-}, il a été montré que ce canal est impliqué dans les sensations mécaniques. La souris KO présente une allodynie et une hyperalgésie durant l'inflammation (Noël et al., 2009).

Lors de ma thèse j'ai pu travailler sur une nouvelle implication de TRAAK dans la douleur. On a pu mettre en évidence que TRAAK peut être régulé par une toxine bactérienne (le mycolactone) *via* le récepteur à l'angiotensine de type II (AT2R). La première partie du projet a permis de mettre en évidence la voie de signalisation impliquée par le mycolactone. La seconde partie est une étude plus poussée des mécanismes d'action impliqués. Tout cela est décrit plus en profondeur dans la partie résultats Article-3.

1.3.2.2.2 Rôle dans le cerveau et la neuroprotection

Parce qu'il est sensible aux neuroprotecteurs PUFAs, il a été proposé que TRAAK puisse être impliqué dans la neuroprotection (Franks and Honoré, 2004). De plus les autres canaux de la sous-famille sont aussi impliqués dans ce mécanisme (Heurteaux et al., 2004).

En 2012 une étude a permis de mettre en évidence l'implication de TRAAK dans le métabolisme du cerveau et son implication dans la neuroprotection (Laigle et al., 2012). L'une des caractéristiques les plus frappantes est que la souris TRAAK^{-/-} a de plus hauts taux de taurine et de *myo*-inositol. Ces deux molécules sont des acteurs importants de la régulation du volume cellulaire (Yancey, 2005). De plus la taurine est un acide aminé connu pour être impliqué dans la stabilisation des membranes, la neurotransmission et la neuroprotection (Saransaari and Oja, 2000; Schaffer et al., 2000). Le *myo*-inositol quant à lui est l'osmolite majoritaire du cerveau (Fisher et al., 2002). TRAAK jouerait donc un rôle dans la sécrétion et la synthèse de ces deux osmolites (Laigle et al., 2012) en régulant l'homéostasie potassique. Cette étude a aussi montré que l'inhibition de TRAAK a un effet neuroprotecteur lors des ischémies.

1.3.2.2.3 Au niveau périphérique

TRAAK a un rôle dans l'envie de miction. En effet il a été observé qu'une obstruction de la vessie diminue l'expression de TRAAK dans la moelle épinière (L6-S1). Cela augmente la sensibilité des neurones et renforce la sensation d'urgence (Wu et al., 2012a). Enfin, TRAAK pourrait avoir un rôle protecteur lors de l'hyperactivité du detrusor en diminuant l'excitabilité neuronale (Zhang et al., 2015b).

Bien que présent dans le myomètre, il n'est pas régulé lors de la grossesse (Buxton et al., 2010).

1.3.2.3 Régulation

1.3.2.3.1 Mécanosensibilité

Avec la sensibilité aux phospholipides, la mécanosensibilité fut l'une des premières régulations caractérisées pour le canal TRAAK (Maingret et al., 1999b). Le mécanisme d'action de l'étirement sur TRAAK est le même que pour TREK-1 et TREK-2. On peut tout de

même noter que c'est grâce à la structure 3D de TRAAK que ce mécanisme a pu être proposé (Brohawn et al., 2012, 2013). TRAAK possède un seuil d'activation plus bas que les TREK (Brohawn et al., 2014b). Comme toute la sous-famille, la sensibilité au stress mécanique provient d'une action directe avec la bicouche lipidique.

Le canal TRAAK existe sous deux formes, une haute et l'autre basse. La tension membranaire fournit assez d'énergie pour passer d'une forme à l'autre et ouvrir le canal.

1.3.2.3.2 Acide arachidonique et phospholipides

Comme son nom l'indique la première régulation caractérisée pour ce canal fut sa sensibilité pour l'acide arachidonique (Fink et al., 1998). Il n'y a pas que l'AA qui peut réguler TRAAK. Le canal est aussi sensible aux autres PUFAs ainsi qu'au LPA. Cependant, les acides gras saturés et les dérivés des PUFAs où le groupement carboxyl terminal est remplacé par un hydroxyle ou un ester, n'ont pas d'effet sur ces canaux (Fink et al., 1998; Maingret et al., 2001). L'effet de l'AA reste conservé en présence d'inhibiteurs d'enzyme métabolisant l'acide arachidonique, laissant penser que l'action du lipide est directe.

Comment les PUFAs peuvent-ils activer TRAAK (et les autres TREK) ? Une des possibilités est qu'il existe une interaction entre le canal et le lipide. Celle-ci se ferait au niveau d'un site de liaison spécifique et induirait une déformation du canal permettant de l'activer, de manière analogue à la régulation ligand-canal que l'on peut observer. Cependant il y a une alternative à ce mécanisme. Les PUFAs pourraient activer le canal de manière indirecte en altérant les propriétés biophysiques de la membrane entourant le canal. (Haswell et al., 2011; Kung, 2005; Phillips et al., 2009).

Lien entre mécano-sensibilité et lipides

Le modèle expliquant la mécano-sensibilité propose que les canaux TREK et TRAAK peuvent être dans deux états (Brohawn et al., 2014b). Une conformation dite basse où le canal est fermé et une conformation dite haute où le canal est ouvert. Le passage d'une conformation à l'autre se fait *via* la membrane plasmique. A une tension basse le canal est généralement en position fermé car il n'a pas l'énergie nécessaire pour passer en configuration haute. Cette énergie permet au canal de "pousser" les lipides de la membrane plasmique pour avoir la "place" d'être en conformation haute. Le canal doit être capable de déformer la membrane lipidique autour de lui. Lorsque la tension augmente, le canal a suffisamment d'énergie pour repousser les lipides et changer ainsi de conformation.

La conséquence de ce modèle est qu'en absence de tension, si la membrane plasmique est plus facilement déformable, alors le canal peut s'ouvrir. Or il est connu que la chaîne polyinsaturée des lipides permet de rendre la membrane plasmique plus facilement déformable (Rawicz et al., 2000).

1.3.2.3.3 Pharmacologie

TRAAK est insensible aux bloqueurs classiques des canaux potassiques tels que le TEA, le 4-AP, la quinine ou le Cs⁺. La Ba²⁺ ne bloque que partiellement le canal. Contrairement aux canaux TREK, TRAAK n'est pas sensible aux anesthésiques volatiles. Par contre, il peut être activé par le riluzole, une molécule neuroprotective (Duprat et al., 2000). Le rutheniumred est un composé inorganique utilisé comme agent fixant en histologie. Il a été montré que celui-ci peut inhiber le canal TRAAK (Braun et al., 2015).

TRAAK peut être activé par le ML67-33, une molécule développée à partir du screen à haut débit réalisé par l'équipe de Daniel L Minor, Jr (Bagriantsev et al., 2013).

1.3.2.3.4 Thermo-sensibilité

La thermo-sensibilité de TRAAK est similaire aux autres canaux TREK (Kang et al., 2005). Les courants de fond augmentent de 7 à 20 fois entre les températures de 14 à 42°C. Le maximum d'activité est compris entre 30 et 42°C.

La thermo-sensibilité des canaux TREK est surtout importante dans leur rôle de perception de la douleur. Malgré le fait que tous ces canaux aient les mêmes propriétés au niveau de leur sensibilité au changement de température, ils jouent des rôles différents dans la nociception. Cette implication différentielle est surtout due à leur expression différente dans les fibres de la douleur (Li and Toyoda, 2015).

1.3.2.3.5 Sensibilité au pH

Le canal TRAAK provenant du rat est sensible à l'alcalinisation et il a été observé un effet synergique entre la mécano-sensibilité et l'alcalinisation du milieu (Kim et al., 2001b).

TRAAK est sensible au pH extracellulaire, le senseur de proton est une histidine en position 85. Le mécanisme de régulation du pH sur TRAAK est le même que pour TREK-1. En effet, la charge nette de la boucle P2M4 est négative (-1). Donc lorsque l'histidine est protonnée à pH acide, les deux boucles vont s'attirer et fermer le canal (Sandoz et al., 2009). TRAAK est ainsi inhibé par l'acidité extracellulaire et activé à pH basique.

1.3.2.3.6 Régulation par les GPCRs

Le canal TRAAK possède au niveau de son domaine C-terminal plusieurs résidus pouvant être potentiellement phosphorylés par la PKA ou la PKC. Cependant celles-ci ne semblent pas avoir d'effet sur l'activité du canal (Chemin et al., 2003; Fink et al., 1998). Cette propriété lui donne la capacité de pouvoir être activé de manière constante par le riluzole (Duprat et al., 2000) alors que TREK-1 n'est activé que de manière transitoire.

J'ai lors de ma thèse étudié une régulation originale de TRAAK par le récepteur couplé aux protéines G AT2R et notamment montré que l'activation de ce récepteur par la toxine mycolactone induisait son activation par une voie indépendante des protéines G.

1.3.2.3.7 Partenaires de TRAAK

Pour l'instant aucun partenaire protéique de TRAAK n'est connu. Cependant étant donné l'homologie de TRAAK avec les autres membres de la famille TREK, il est envisageable que ce canal soit dans des complexes protéiques. De plus, lors de ma thèse j'ai travaillé sur l'hétéromérisation entre TRAAK et les autres canaux TREK. Il est apparu que l'hétéromère TREK-1-TRAAK est capable de s'associer avec une protéine régulatrice de TREK-1: la PLD2.

Enfin le dernier projet de ma thèse a consisté en l'étude de l'activation de ce canal par le récepteur à l'angiotensine II de type 2. Plusieurs preuves laissent penser que le canal et le récepteur sont dans le même domaine de régulation. Tout cela sera discuté plus tard dans le mémoire au sein de la partie Régulation de TRAAK par le Mycolactone.

I.3.3 Structure générale des canaux TREK

I.3.3.1 Structure de base

En 2012, la structure cristallographique de TWIK-1 et TRAAK a pu être déterminée (Brohawn et al., 2012; Miller and Long, 2012), cela fut une grande avancée dans la compréhension de la structure des K_{2P} . En 2015 c'est la structure de TREK-2 qui fut caractérisée (Dong et al., 2015), permettant de mieux comprendre certains mécanismes de "gating", dont la sensibilité à l'étirement.

La structure de TWIK-1 et TRAAK est relativement similaire. Le canal possède un "chapeau" extracellulaire, celui-ci est composé des hélices dite "cap" C1 et C2. Cette structure est spécifique au K_{2P} . Le "cap" s'étend d'environ 35Å au-dessus de la membrane plasmique. Il couvre un vestibule extracellulaire et possède deux importants "portails" latéraux permettant le passage des ions. Les hélices M2 et M4 flanquant le pore du canal traversent la membrane de manière oblique. Les hélices plus extérieures quant à elles, traversent la membrane de manière verticale. (Figure 38)

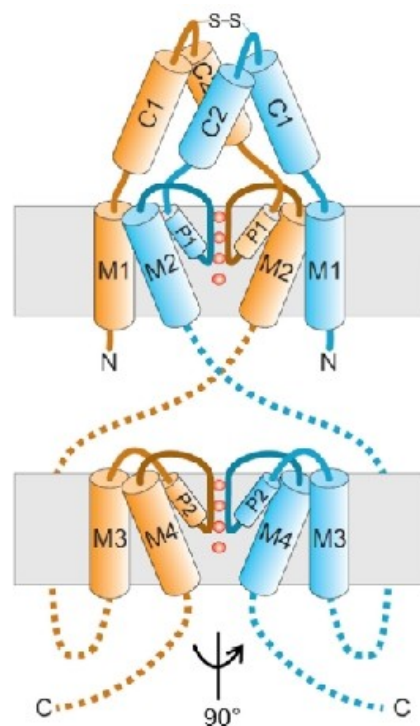


Figure 38: Structure des K_{2P} . Chaque sous-unité est représentée par une couleur différente. (A) Schéma de la partie N-terminale de chaque sous-unité comprenant les domaines M1, C1, C2, P1 et P2. (B) Schéma de la partie C-terminale de chaque sous-unité, comprenant les domaines M3, P2 et M4. Modifié à partir de Renigunta et al., 2015.

Ces propriétés peuvent être appliquées à tous les K_{2P} . Au niveau des segments M3 et M4 le canal possède une fenêtre latérale qui fait face aux lipides de la membrane. Le filtre de sélectivité et les hélices du pore présentent une symétrie selon 4 parties et les deux sous-unités sont assemblées de manière antiparallèles.

1.3.3.1.1 Les 2 conformations:

C'est la caractérisation de la structure de TREK-2 (Dong et al., 2015) qui a permis de mettre en évidence que le canal a deux conformations possibles. La différence entre ces deux conformations est centrée autour de la section inférieure des hélices M2, M3 et M4.

Dans la conformation dite haute le segment M4 est courbé vers le haut au niveau d'une glycine charnière. C'est aussi le cas pour les hélices M2 et M3 qui *via* une glycine charnière sont courbés vers la membrane. Dans cette conformation la fenêtre latérale est fermée. Dans la conformation dite basse ces 3 hélices projettent droit vers le cytoplasme et la fenêtre latérale est ouverte. Le passage d'une conformation à l'autre se fait par un mouvement coordonné des 3 hélices. Les différentes régulations de TREK comme l'étirement, l'acide arachidonique ou le Prozac® jouent sur l'énergie nécessaire au passage d'une conformation à l'autre ou sur la stabilisation d'une conformation.

1.3.3.1.2 Les fenêtres latérales:

Les K_{2P} possèdent une ouverture latérale au niveau de la jonction entre le domaine M2 d'une sous-unité et le domaine M4 de l'autre sous-unité (Brohawn et al., 2012; Miller and Long, 2012). Cette fenêtre connecte la cavité interne du canal avec le cœur hydrophobe de la membrane plasmique. Cette cavité est entourée de résidus hydrophobes et pourrait être remplie de la queue hydrophobe d'un phospholipide membranaire (Figure 39).

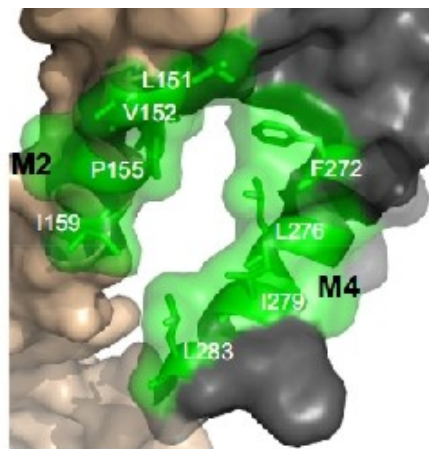


Figure 39: Représentation cristallographique de la fenêtre latérale du canal TRAAK. Les sous-unités du canal sont représentées de deux couleurs différentes. Les résidus hydrophobes sont en verts. Modifié à partir de Renigunta et al., 2015.

L'interaction entre ce lipide et le canal pourrait influencer la régulation du canal (Renigunta et al., 2015). La structure de TREK-2 a permis d'en savoir plus sur cette fenêtre. Celle-ci n'est présente que dans une conformation du canal dite basse. En configuration haute cette structure est fermée par le mouvement ascendant et la rotation du domaine M4. De plus cette étude a permis de montrer qu'il peut effectivement y avoir une chaîne lipidique dans cette fenêtre et que celle-ci va jusqu'au vestibule interne du canal (Dong et al., 2015). Enfin cette structure peut aussi accueillir des molécules pharmacologiques comme le Prozac®.

1.3.3.2 « Gating » des K_2P .

1.3.3.2.1 Régulation du filtre de sélectivité:

Le contrôle de l'ouverture du filtre de sélectivité se fait via des changements de conformation des hélices transmembranaires et des régions qui leur sont attachées. Ces mouvements peuvent être dus au changement de pH intracellulaire (Piechotta et al., 2011; Rapedius et al., 2012).

1.3.3.2.2 Régulation via le chapeau extracellulaire

La régulation par le pH extracellulaire ou des cations divalents dépend de résidus présents dans le vestibule extracellulaire. Celui-ci étant couvert par le chapeau extracellulaire, le chemin des ions extracellulaires est un étroit tunnel qui contient de nombreux résidus chargés qui ne permettent le passage que d'un ion hydraté à la fois. Comme nous l'avons vu dans la régulation de la sous famille TREK par le pH extracellulaire c'est l'environnement électrostatique du vestibule extracellulaire ainsi que la protonation de l'histidine senseur du pH qui permet de réguler le passage ou non des ions potassium (Sandoz et al., 2009). La protonation de l'histidine senseur peut influencer le passage des ions de deux manières. Soit en induisant un changement de conformation du filtre de sélectivité. Soit en modifiant l'environnement électrostatique du vestibule qui permet de moduler la concentration local de K^+ . Cela influence l'occupation du filtre de sélectivité par le potassium (Renigunta et al., 2015).

1.3.3.2.3 Régulation via les fenêtres latérales

Ces domaines sont très importants dans la régulation des canaux TREK. En effet ils sont responsables en autres de leurs sensibilités au stress mécaniques et au PUFAs. Cette régulation est fortement liée à la conformation du canal.

II Résultats

II.1 ARTICLE 1 : La régulation spécifique de TREK-1 par la phospholipase D2 via une interaction directe et la production locale d'acide phosphatidique.

II.1.1 Introduction

TREK-1 est le canal le plus étudié des K_{2p} pour plusieurs raisons. Il génère des courants facilement identifiables dans les systèmes d'expression hétérologue (œufs de xénope ou lignées cellulaires) et très vite, il est apparu, qu'il est impliqué dans plusieurs mécanismes physiologiques (perception de la douleur) et pathologiques (dépression). TREK-1 est exprimé dans de nombreux tissus: on le retrouve au niveau du système nerveux central (ex: hippocampe, cervelet), du système nerveux périphérique (ex: neurones des DRG) et au niveau périphérique (ex: cœur). Le rôle central de TREK-1 dans ces différents mécanismes, et le rôle secondaire qu'il peut avoir dans plusieurs autres, font de ce canal une protéine finement régulée. TREK-1 peut être modulé par des *stimuli* physicochimiques, par des protéines partenaires, des neurotransmetteurs *via* leurs récepteurs couplés aux protéines G et *via* divers composés chimiques. TREK-1 est sensible aux acides gras polyinsaturés (PUFAs), aux lysophospholipides (LPA) et aux phospholipides. On peut noter que ces lipides n'ont pas tous le même mécanisme d'action sur le canal TREK-1. En effet, les phospholipides régulent TREK-1 via le domaine C-terminal du canal. En présence de phospholipides avec une tête polaire chargée négativement, le domaine C-terminal (chargé positivement) est attiré vers la membrane plasmique ce qui permet d'augmenter l'activité du canal (Chemin et al., 2005a; Sandoz et al., 2009).

II.1.1.1 Phospholipides et canaux

Les seconds messagers lipidiques, issus des phospholipides, sont d'importants régulateurs des canaux ioniques et jouent un rôle central dans plusieurs mécanismes physiologiques (Hansen, 2015). Leur action est en lien étroit avec l'activité des enzymes qui les synthétisent comme par exemple les phospholipases qui modifient leur tête polaire. La phospholipase D2 (PLD2) est une de ces enzymes. Elle est majoritairement membranaire et appartient à la superfamille des phosphohydrolases. Elle fut décrite pour la première fois chez les mammifères par Saito et Kanfer en 1973, à partir d'extraits membranaires de cerveau de rat (Saito and Kanfer, 1973). Il existe 2 isoformes de la PLD chez les mammifères: la PLD1 et la PLD2 (50% d'homologie) possédant elles-mêmes plusieurs variants d'épissage. La PLD1 est surtout localisée dans les membranes périnucléaires et golgiennes. La PLD2 est surtout localisée au niveau de la membrane plasmique. De plus, ces isoformes ne sont pas régulées de la même manière. En effet, la PLD1 a une faible activité basale et est fortement régulée. Au contraire, la PLD2 a une forte activité basale et est faiblement régulée (Colley et al., 1997).

La PLD catalyse la réaction d'hydrolyse d'un phospholipide pour libérer d'une part sa tête polaire et d'autre part un lipide considéré comme un second messager : l'acide

phosphatidique (AP). L'AP comme le PIP_2 est un phospholipide avec une tête polaire chargée négativement qui est impliqué dans de nombreux mécanismes physiologiques comme par exemple dans le métabolisme et la signalisation moléculaire (English, 1996). Cependant, contrairement au PIP_2 , l'AP a un temps de demi-vie court et est rapidement converti en diacylglycerol (DAG) par la DAG-kinase (Cazzolli et al., 2006; Nanjundan and Possmayer, 2003). La PLD2 est une cible de l'éthanol. En effet, les alcools primaires ont une affinité plus grande que l'eau pour le site catalytique de l'enzyme. Ainsi, en présence d'éthanol ou de but-1-ol l'enzyme synthétisera préférentiellement du phosphatidyléthanol (PEth) ou du phosphatidylbutanol (Yang et al., 1967). Contrairement à l'acide phosphatidique, le phosphatidyléthanol (PEtOH) a un temps de demi-vie très long dans le sang d'environ 4 jours (Hannuksela et al., 2007). Lors d'une prise importante d'alcool ce phospholipide s'accumule dans les membranes, modifiant alors la double couche lipidique (Omodeo-Salé et al., 1991).

Dans le cas des régulations des canaux par des seconds messagers diffusibles (AMPC, GMPC, Ca^{2+} ...), l'entrée et la sortie de la voie de régulation sont inclus généralement dans un même microdomaine assurant ainsi une spécificité de régulation (Bockaert et al., 2010; Welch et al., 2010). Par exemple, TREK-1 comme de nombreuses protéines transmembranaires peut être régulé spécifiquement en étant dans un complexe protéique. Le canal peut interagir avec la protéine d'échafaudage AKAP150 (AKAP79); celle-ci permet de rapprocher le récepteur couplé aux protéines G (voie d'entrée) du canal TREK-1 (voie de sortie) et la PKA (enzyme qui phosphoryle le canal) facilitant ainsi la phosphorylation du canal par cette dernière suite à l'activation du RCPG (Sandoz and Lesage, 2008; Sandoz et al., 2006).

Dans le cas des phospholipides, les choses sont moins claires. En effet, ils sont la plupart du temps au centre de nombreuses voies de signalisations et il y a peu de travaux qui expliquent comment un certain phospholipide régule spécifiquement une protéine effectrice cible. Une possibilité serait leur production locale grâce à l'interaction de leur enzyme avec les protéines cibles.

J'ai au cours de ce projet étudié comment l'acide phosphatidique peut réguler de manière spécifique les canaux TREK-1 et TREK-2.

II.1.2 Article

Phospholipase D2 specifically regulates TREK potassium channels via direct interaction and local production of phosphatidic acid

Yannick Comoglio^{a,b,c,d,1}, Joshua Levitz^{e,f,1}, Michael A. Kienzler^e, Florian Lesage^{a,d,g}, Ehud Y. Isacoff^{e,f,h}, and Guillaume Sandoz^{a,b,c,d,2}

^aUniversité Nice Sophia Antipolis, Institut de Biologie Valrose, Unité Mixte de Recherche 7277, 06100 Nice, France; ^bCentre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biologie Valrose, Unité Mixte de Recherche 7277, 06100 Nice, France; ^cInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Institut de Biologie Valrose, U1091, 06100 Nice, France; ^dLaboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, 06100 Nice, France; ^eDepartment of Molecular and Cell Biology and Helen Wills Neuroscience Institute, University of California, Berkeley, CA 94720; ^fBiophysics Graduate Group, University of California, Berkeley, CA 94720; ^gPhysical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94703; and ^hInstitut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, Centre National de la Recherche Scientifique, and Université Nice Sophia Antipolis, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

Edited by Ramon Latorre, Centro Interdisciplinario de Neurociencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile, and approved August 12, 2014 (received for review April 22, 2014)

Membrane lipids serve as second messengers and docking sites for proteins and play central roles in cell signaling. A major question about lipid signaling is whether diffusible lipids can selectively target specific proteins. One family of lipid-regulated membrane proteins is the TWIK-related K channel (TREK) subfamily of K_{2P} channels: TREK1, TREK2, and TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK). We investigated the regulation of TREK channels by phosphatidic acid (PA), which is generated by phospholipase D (PLD) via hydrolysis of phosphatidylcholine. Even though all three of the channels are sensitive to PA, we found that only TREK1 and TREK2 are potentiated by PLD2 and that none of these channels is modulated by PLD1, indicating surprising selectivity. We found that PLD2, but not PLD1, directly binds to the C terminus of TREK1 and TREK2, but not to TRAAK. The results have led to a model for selective lipid regulation by localization of phospholipid enzymes to specific effector proteins. Finally, we show that regulation of TREK channels by PLD2 occurs natively in hippocampal neurons.

potassium channels | neuron excitability | alcohol | micro-regulatory domain | K_{2P}.1

Growing evidence indicates that the trafficking and function of membrane proteins, including ion channels and receptors, can be regulated by both their associated protein and lipid environments. Membrane lipids play a key role in intracellular signal transduction via lipid mediators that act as second messengers and docking sites for proteins. Membrane phospholipids, specifically, function as signaling molecules that are able to exert their effects on membrane proteins dynamically in conjunction with enzymes, such as phospholipases, which alter their phosphate head groups. Phospholipase D (PLD) is an enzyme that catalyzes the hydrolysis of the membrane phospholipid phosphatidylcholine to produce phosphatidic acid (PA). PA, much like phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), is a second messenger that is involved in a variety of cellular functions such as cell proliferation, cytoskeleton organization, morphogenesis, and vesicle trafficking (1–3). However, unlike PIP₂, following its production by PLD, PA is extremely short-lived and is rapidly converted to DAG by DAG kinase, which raises the question of how PLD activity can effectively regulate cellular processes (4, 5). Notably, primary alcohols can compete with water as a substrate for PLD2, which can lead to the production of phosphatidylethanol (PEtOH) or phosphatidylbutanol-1-ol (P-1-BtOH) rather than PA (6). There are two mammalian isoforms of PLD, PLD1 and PLD2, which share 50% amino acid identity and are both widely expressed in the nervous system (7).

The family of K_{2P} channels serves as a hub for the generation and regulation of a negative resting membrane potential throughout the nervous system. The members of the TWIK-related K channel (TREK) subfamily of K_{2P} channels, TREK1 (K_{2P}2.1), TREK2

(K_{2P}10.1), and the more evolutionarily distant TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) (K_{2P}4.1) channel, are widely expressed in the nervous system (8, 9). TREK1 gene knock out produces mice with reduced sensitivity to volatile anesthetics (10), impaired neuroprotection afforded by PUFAs against ischemia (10), and altered pain perception (11). In addition, loss of TREK1 renders mice resistant to depression, suggesting TREK1 as a candidate target for antidepressant medications (12). Although classical methods of genetic knockout or pharmacological approaches have been used for most work on TREK channels, we recently developed the photoswitchable conditional subunit (PCS) method, which allows us to endow endogenous TREK1 channels with light sensitivity. The PCS technique allows for the study of native TREK1 channels without the need for transgenic manipulation or nonspecific pharmacological agents. Previously, we used the TREK1-PCS method to discover a role for TREK1 in mediating the hippocampal GABA_B response (13).

In many cases, regulation of membrane proteins is mediated by the organization of complexes between various proteins and signaling molecules that serve to enhance both the speed and specificity of the regulation (14, 15). For example, TREK1 interacts with AKAP150 (AKAP79), a scaffolding protein, which brings protein kinase A (PKA) into the proximity of TREK1 to

Significance

Our work provides evidence for a mechanism for the formation of membrane microdomains in which the local concentration of a phospholipid can change independently of the bulk membrane to confer selectivity on membrane protein regulation. We found that, despite the fact that all TWIK-related K channel (TREK) family members are sensitive to phosphatidic acid (PA), only TREK1 and TREK2 are potentiated by phospholipase D2 (PLD2) (which produces PA), but not by PLD1. This surprising specificity is due to the direct binding of PLD2 to TREK. This binding allows a local PA production that tonically activates the channel. Furthermore, we found the local signaling via PA to have a secondary focusing effect for primary alcohols, which inhibit the channel by altering the PA microdomain.

Author contributions: Y.C., J.L., E.Y.I., and G.S. designed research; Y.C., J.L., M.A.K., and G.S. performed research; M.A.K. and F.L. contributed new reagents/analytic tools; Y.C., J.L., and G.S. analyzed data; and Y.C., J.L., E.Y.I., and G.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹Y.C. and J.L. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: sandoz@unice.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1407160111/-DCSupplemental.

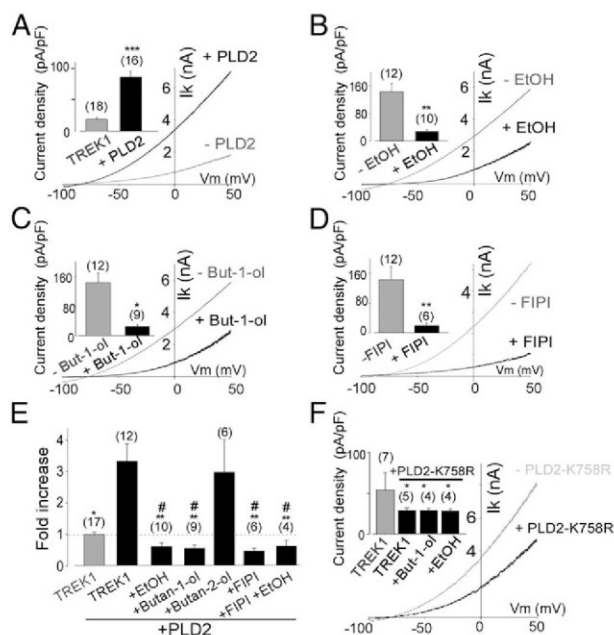


Fig. 2. TREK1 is potentiated by PLD2 in a PA-dependent manner. (A and B) TREK1 is potentiated by PLD2 coexpression. (A) Representative traces showing that PLD2 coexpression increases TREK1 current. (Inset) Bar graph showing the TREK1 current densities in the presence or absence of coexpression of PLD2. Student *t* test ($***P < 0.001$) shows the difference between TREK1 and TREK1 coexpressed with PLD2. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. (B–E) Primary alcohols and FIPI abolish the potentiation of TREK1 current by PLD2. Representative traces showing effects of protracted ethanol (B), butan-1-ol (C), or FIPI (D) application on TREK1 current in the presence of PLD2. (Insets) TREK1 current densities before and after treatments. (E) Summary of normalized amplitude of TREK1 current in the presence of PLD2 after protracted treatment with alcohol, FIPI, or both. Student *t* tests ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$) show the difference between TREK1 coexpressed with PLD2 and after ethanol, butan-1-ol, or butan-2-ol application. Student *t* tests ($#P < 0.05$) show the difference between TREK1 and TREK1 coexpressed with PLD2 after either ethanol or butan-1-ol or butan-2-ol application. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. (F) A catalytically inactive mutant of PLD2 (PLD2-K758R) decreases TREK1 current. Representative traces showing that coexpression of PLD2-K758R decreases TREK1 current. (Inset) Summary of TREK1 current densities in the presence or absence of coexpressed PLD2-K758R and before and after protracted primary alcohol application are shown. Student *t* tests ($*P < 0.05$) show the difference between TREK1 and TREK1 coexpressed with PLD2-K758R with or without protracted primary alcohol exposure. The numbers of cells tested are indicated in parentheses.

serve as alternative substrates in PLD-catalyzed transphosphatidylation to produce phosphatidylalcohols instead of PA, these results suggest that the inhibition of TREK1 by primary alcohols is mediated by inhibition of the production of PA by PLD2. To confirm that the effect of alcohol on TREK1 is directly linked to inhibition of PA production, we used the recently developed, specific PLD inhibitor 5-fluoro-2-indolyl des-chloro-halopemide (FIPI) (25). Incubation for 1 h with FIPI reduced TREK1 plus PLD2 current by 76% to a level similar to primary alcohol incubation (Fig. 2D and E) (current density was 19 ± 4 pA/pF for TREK1 plus PLD2 plus FIPI; $P < 0.01$ for TREK1 plus PLD2 vs. TREK1 plus PLD2 plus FIPI). Furthermore, coapplication of primary alcohol and FIPI did not show an additional inhibitory effect, indicating that both treatments may work through the same mechanism (Fig. 2E) (current density was 24 ± 6 pA/pF; $P > 0.4$ for TREK1 plus PLD2 plus FIPI vs. TREK1 plus PLD2 plus FIPI plus EtOH and $P > 0.6$ for TREK1 plus PLD2 plus EtOH vs. TREK1 plus PLD2 plus FIPI plus

EtOH). In addition, FIPI reduced TREK1 current densities to similar levels with or without PLD2 coexpression as was also observed for primary alcohol treatment (SI Appendix, Fig. S2). These results strongly support the idea that PLD2 potentiates TREK1 channel activity through production of PA.

PLD2-Mediated Potentiation of TREK1 Requires Basic Residues in the TREK1 C Terminus. Our results so far indicate that regulation of TREK1 channels by PLD2 depends on the production of PA by PLD2. To further test this idea, we turned our attention to the portion of the TREK1 channel that is known to be essential for PA regulation, and where PA has been conjectured to bind (18). Stimulation of TREK1 by PA depends on five positively charged residues in the TREK1 carboxyl-terminal domain (Ctd) and the negative charge of the phosphate group of PA. This modulation can be eliminated by mutation of the positively charged residues to produce “TREK1-pentaA.”

To test whether the ability to sense phospholipids is required for TREK1 to be potentiated by PLD2, we examined the effect of PLD2 coexpression on TREK1-pentaA. Unlike in wild-type TREK1, TREK1-pentaA was not potentiated by PLD2 coexpression (SI Appendix, Fig. S3). Together with the suppression of PLD2 modulation of TREK1 by primary alcohols and FIPI, this result argues that enzymatic production of PA by PLD2 is required for stimulation of TREK1.

A Catalytically Inactive Mutant of PLD2 Decreases TREK1 Current. Our findings that protracted exposure to primary alcohols and FIPI reduces TREK1 current in cells transfected with only TREK1, that the magnitude of this suppression is far greater when PLD2 is coexpressed, and that the current that remains after primary alcohol or FIPI treatment is the same whether or not PLD2 is coexpressed suggest that endogenous PLD2 tonically stimulates TREK1 and that this stimulation is suppressed by primary alcohols or FIPI. To test whether TREK1 is regulated by endogenous PLD2, we coexpressed a catalytically inactive mutant of PLD2 (PLD2-K758R) (26, 27). Coexpression of PLD2-K758R significantly decreased the TREK1 current (Fig. 2F) (current densities were 51 ± 7 pA/pF and 28 ± 3 pA/pF for TREK1 and TREK1 plus PLD2-K758R, respectively; $P < 0.05$). This suppression was similar to that elicited by protracted application of primary alcohols and FIPI (Fig. 1 and SI Appendix, Fig. S2). Moreover, protracted primary alcohol application did not further inhibit TREK1 current when PLD2-K758R was coexpressed (Fig. 2F) (current densities were 30 ± 4 pA/pF for TREK1 plus PLD2-K758R plus ethanol, $P > 0.6$; and 29 ± 4 pA/pF for TREK1 plus PLD2-K758R plus butan-1-ol, $P > 0.7$), which is consistent with a dependency of primary alcohol regulation of TREK on PLD2.

The ability of the overexpressed catalytically inactive form of PLD2 to prevent endogenous wild-type PLD2 from stimulating TREK1 could be explained by competition for localization to the vicinity of TREK1. We therefore examined this possibility by asking whether the channel and enzyme directly associate.

PLD2, but Not PLD1, Specifically Regulates TREK1 Through Direct Interaction. Having found that PLD2 modulates TREK1, we asked whether a related phospholipase D, PLD1, has the same effect. Whereas coexpression of PLD2 significantly increased TREK1 current (Fig. 3A and B) (current densities were 168 ± 28 pA/pF for TREK1 plus PLD2 versus 41 ± 8 pA/pF for TREK1 alone; $P < 0.001$), coexpression of PLD1 had no effect on TREK1 current (Fig. 3A and B) (current density was 58 ± 9 pA/pF for TREK1 plus PLD1; $P > 0.6$).

We asked whether the ability of PLD2, but not PLD1, to stimulate TREK1 could be accounted for by direct association of only PLD2 with the TREK1 channel. PLD2 was coimmunoprecipitated with TREK1, but PLD1 was not (Fig. 3C). As a control, in the absence of TREK1 expression, anti-TREK1 antibodies did not precipitate PLD2 (Fig. 3C). Furthermore,

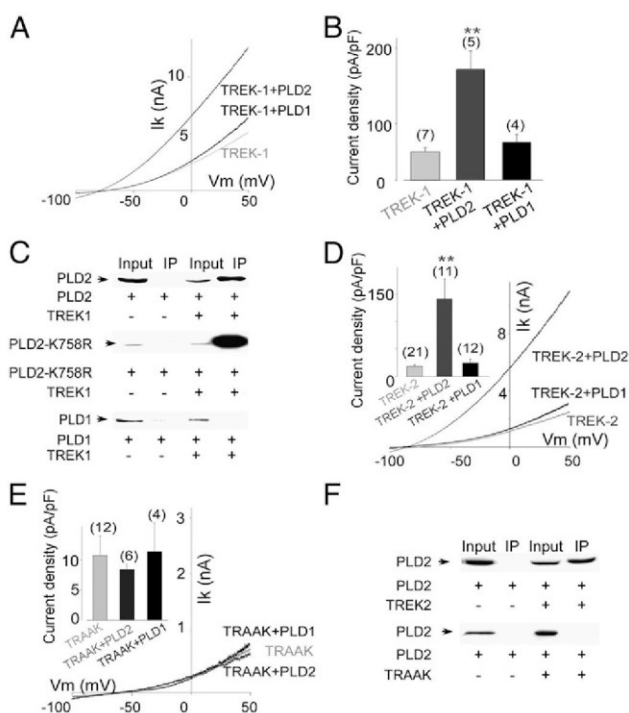


Fig. 3. PLD2, but not PLD1, specifically regulates TREK1 and TREK2 but not TRAAK. (A–C) Unlike PLD2, PLD1 does not regulate TREK1. (A) Representative traces showing the effects of PLD1 and PLD2 coexpression on TREK1 current. (B) Summary of TREK1 current in the presence or absence of either PLD1 or PLD2. Student *t* tests (***P* < 0.01) show the difference between TREK1 and TREK1 coexpressed with PLD2 or PLD1. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. (C) Coimmunoprecipitation of PLD2 (Top), PLD2-K758R (Middle), or PLD1 (Bottom) by anti-TREK1 antibodies from transfected HEK 293T cells. (D–F) PLD2 specifically regulates TREK1 and -2, but not TRAAK. (D) PLD2 coexpression potentiates TREK2 current whereas PLD1 does not. (Inset) TREK2 current densities in the presence or absence of either coexpressed PLD2 or PLD1. (E) PLD2 or PLD1 coexpression does not alter TRAAK current. (Inset) TRAAK current densities in the presence or absence of coexpressed PLD2 or PLD1. (F, Upper) Coimmunoprecipitation of PLD2 by anti-TREK2 antibodies from transfected HEK 293T cells. (Lower) Coimmunoprecipitation of PLD2 by anti-TRAAK antibodies from transfected HEK 293T cells.

using immunocytochemistry, we found that TREK1 and PLD2 colocalize in HEK 293T cells (SI Appendix, Fig. S4A), but TREK1 and PLD1 do not (SI Appendix, Fig. S4B). In addition, PLD2-K758R is also able to coimmunoprecipitate with TREK1 (Fig. 3C), confirming the hypothesis that it competes with endogenous PLD2 to decrease TREK1 current (Fig. 2F). Taken together, these results indicate that PLD2 interacts with TREK1 but that PLD1 does not and that this observation explains the exclusive modulation of the channel by PLD2.

PLD2 Is Able to Potentiate TREK2, but Not TRAAK. Having observed that PLD2 interacts with and regulates TREK1 but that PLD1 does not, we asked whether the interaction and modulation extend to other members of this K_{2p} subfamily of channels. To test this possibility, we coexpressed PLD2 with TREK2 and the more distantly related TRAAK channel. TREK2 and TRAAK, like TREK1, are lipid and mechano-gated and display the same P-sensitivity as TREK1 (18) (SI Appendix, Fig. S5). PLD2 coexpression significantly increased TREK2 current (Fig. 3D) (current densities were 24 ± 3 pA/pF for TREK2 alone and 144 ± 29 pA/pF for TREK2 plus PLD2; *P* > 0.01) but did not significantly affect TRAAK current (Fig. 3E) (current densities were 8 ± 3 pA/pF for TRAAK alone and 8 ± 3 pA/pF for TRAAK plus PLD2; *P* > 0.8).

Consistent with these results, PLD2 was coimmunoprecipitated with TREK2 (Fig. 3F), but not with TRAAK (Fig. 3F). As a control, in the absence of TREK2 expression, anti-TREK2 antibodies did not precipitate PLD2 (Fig. 3F), confirming the specificity of the assay. In addition, immunocytochemistry of PLD2 and TREK2 showed colocalization (SI Appendix, Fig. S4C) whereas TRAAK and PLD2 showed no overlap (SI Appendix, Fig. S4D). Furthermore, we found that PLD1 coexpression did not affect TREK2 current (SI Appendix, Fig. S6E) (current densities were 31 ± 11 pA/pF for TREK2 alone and 39 ± 21 pA/pF for TREK2 plus PLD1; *P* > 0.9 for TREK2 alone vs. TREK2 plus PLD1). These results suggest that PLD2 interacts with, and thus regulates, TREK2, which is closely related to TREK1, but not the more distantly related TRAAK.

To further test the idea that direct interaction between enzyme and channel is necessary for the channel to be potentiated, we forced an interaction between TRAAK and PLD2 by fusing the proteins to one another to produce a PLD2-TRAAK tandem (Fig. 4A). PLD2-TRAAK showed significantly increased current compared with TRAAK alone (Fig. 4B) (current densities were 5.5 ± 2 pA/pF for TRAAK alone and 51 ± 13 pA/pF for PLD2-TRAAK; *P* < 0.01). Similarly to TREK1 and TREK2, protracted application of ethanol reduced the current density of PLD2-TRAAK to the amplitude observed for TRAAK alone, indicating that PLD2-mediated production of PA is required for the potentiation observed with PLD2-TRAAK (SI Appendix, Fig. S8). These results are consistent with the notion that anchoring of PLD2 to the channel enables it to regulate the channel's activity via its local enzymatic activity.

We next investigated to which part of the channel PLD2 binds. We hypothesized that this interaction may take place in the Ctd because this region is the major part of TREK channels that is accessible to the cytosol and this domain is highly conserved

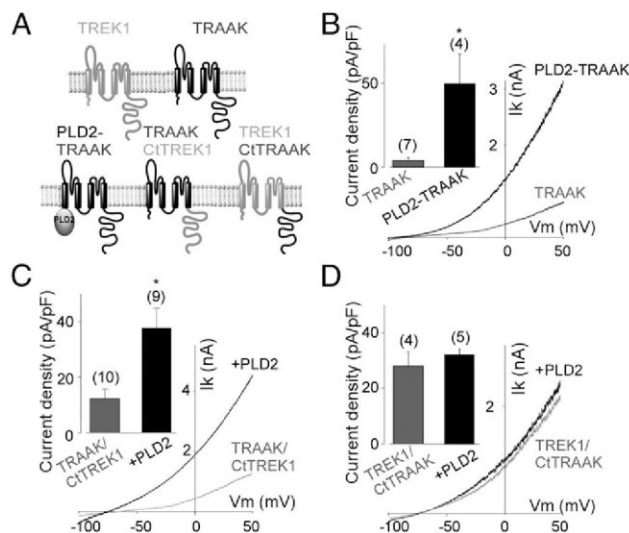


Fig. 4. Binding of PLD2 to the cytoplasmic tails of TREK1 and TREK2 enables specific regulation. (A) Schematic representing the different constructs used. (B) N-terminal fusion of PLD2 to TRAAK potentiates TRAAK current. (Inset) Comparison of TRAAK and PLD2-TRAAK current densities. (C and D) The specificity of PLD2 regulation of TREK1 is mediated by the cytoplasmic tail of TREK1. (C) PLD2 coexpression potentiates current from a chimeric TRAAK/Ct-TREK1 channel containing the core region of TRAAK fused to the cytoplasmic Ctd of TREK1. (Inset) TRAAK/Ct-TREK1 current densities in the presence or absence of coexpressed PLD2. (D) PLD2 coexpression does not alter current from a chimeric TREK1/Ct-TRAAK channel containing the core region of TREK1 fused to the cytoplasmic Ctd of TRAAK. (Inset) TREK1/Ct-TRAAK current densities in the presence or absence of coexpressed PLD2. Student *t* tests (**P* < 0.05) show the difference between PLD2 potentiation of PLD2-TRAAK, TRAAK/CtTREK1 or TREK1/CtTRAAK. The numbers of cells tested are indicated in parentheses.

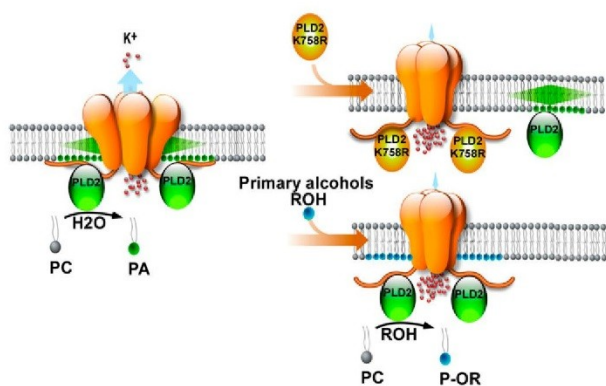


Fig. 5. Model of channel regulation by PLD2. PLD2 is associated with TREK1 and creates a microdomain rich in PA (the gradient of PA is represented by a green arrow) that activates the channel at rest. PLD2-K758R displaces the endogenous PLD2, which reduces the local PA concentration near the channel and therefore reduces TREK channel activity. Alternatively, primary alcohols (ROH) compete with water in the catalytic site of PLD2, which also leads to a reduction of the local PA concentration near the channel and causes a decrease in TREK channel activity.

between TREK1 and -2 (9). To test this hypothesis, we designed chimeras between TRAAK and TREK1 to see whether we could transfer PLD2 sensitivity to TRAAK. The Ctd of TRAAK was replaced by the corresponding Ctd of TREK1 to form TRAAK/Ct-TREK1, and the Ctd of TREK1 was replaced by the corresponding Ctd of TRAAK to form TREK1/Ct-TRAAK (Fig. 4A). Unlike wild-type TRAAK, TRAAK/Ct-TREK1 was sensitive to PLD2 (Fig. 4C) (current densities were 12 ± 3 pA/pF and 36 ± 7 pA/pF for TRAAK/Ct-TREK1 and TRAAK/Ct-TREK1 plus PLD2, respectively; $P < 0.05$). However, TREK1/Ct-TRAAK was not sensitive to PLD2 coexpression (Fig. 4D) (current densities were 26 ± 4 pA/pF and 29 ± 2 pA/pF for TREK1/Ct-TRAAK and TREK1/Ct-TRAAK plus PLD2 respectively; $P > 0.8$). These results indicate that the specificity of PLD2 depends on the TREK1 Ctd because the Ctd specifically binds to PLD2 (Fig. 5).

PA Regulates Native TREK1 Channels Through Physical Coupling Between TREK1 and Endogenous PLD2 in Hippocampal Neurons. TREK channels are natively expressed in the hippocampus where they contribute to the response to GABA_B receptor activation and are inhibited by protracted primary alcohol application (Fig. 1B). Accordingly, we wondered whether hippocampal TREK1 channels are regulated by endogenous PLD2 and whether this measurement can explain their alcohol sensitivity. To investigate this regulation in the native hippocampal TREK1 channels, we coexpressed the catalytically inactive mutant of PLD2, PLD2-K758R, along with the TREK1-PCS (13).

In cultured hippocampal neurons transfected with the TREK1-PCS, alternating illumination between 380 nm and 500 nm modulated the resting membrane potential by 4.3 ± 0.9 mV (Fig. 6A). Coexpression of PLD2-K758R decreased this voltage change significantly (Fig. 6B and E) (1.3 ± 0.2 mV; $P < 0.01$). Consistent with this voltage change decrease, at a holding potential of -20 mV, TREK1-PCS transfected neurons had photocurrents of 20 ± 4 pA (Fig. 6C) and coexpression of PLD2-K758R reduced the photocurrents to 4.8 ± 1.7 pA (Fig. 6D and F) ($P < 0.01$) as was observed for protracted EtOH application (Fig. 1B). These results show that, in hippocampal neurons, native TREK1 and PLD2 coassemble and that this coassembly leads to a tonic increase in TREK1 activity.

Discussion

We report a novel mechanism for the specific regulation of ion channels by an enzyme that generates signaling lipids. We found that the K_{2P} potassium channels TREK1 and TREK2 are potentiated by the phospholipase PLD2, which produces the charged signaling phospholipid PA from phosphatidylcholine. Surprisingly, PLD2 was unable to regulate the related TRAAK channel despite the fact that TRAAK responds to PA in a similar manner to TREK1 and TREK2. Furthermore, we found that PLD1, which catalyzes the same reaction as PLD2, has no effect on TREK1 or TREK2, indicating that this regulation is specific to the subtype of enzyme and not based on a bulk effect on plasma-membrane composition.

We found that the specific regulation that we observed by only one of the PLDs on two of the three PA-sensitive K_{2P} channels could be explained by selective colocalization. First, TREK1 and TREK2 directly interact with PLD2, but TRAAK does not, explaining the selective activation of the TREKs by PLD2. Second, PLD1 does not interact with TREK1, explaining its lack of effect. Third, fusion of the PLD2 to TRAAK renders TRAAK responsive to PLD2. Finally, replacement of the TRAAK Ctd with that of TREK1 endowed TRAAK with sensitivity to PLD2 whereas replacement of the TREK1 Ctd with that of TRAAK eliminated the sensitivity of TREK1 to PLD2. These results suggest that PLD2 specificity is due to direct interaction of PLD2 with either TREK1 or TREK2 via the Ctd of the channel. This interaction appears likely to be direct, but we cannot fully exclude the possibility of the presence of an adaptor protein that allows PLD2 and TREK to interact with each other. One possible adaptor, which is endogenously expressed at low levels in HEK293 cells, is AKAP79. However, we found that AKAP79 does not play a role in this regulation because shRNA, which targets AKAP79 (28), did not modify TREK1 regulation by PLD2 (SI Appendix, Fig. S10). We propose that, by complexing with TREK1 or TREK2, PLD2 is able to alter the local

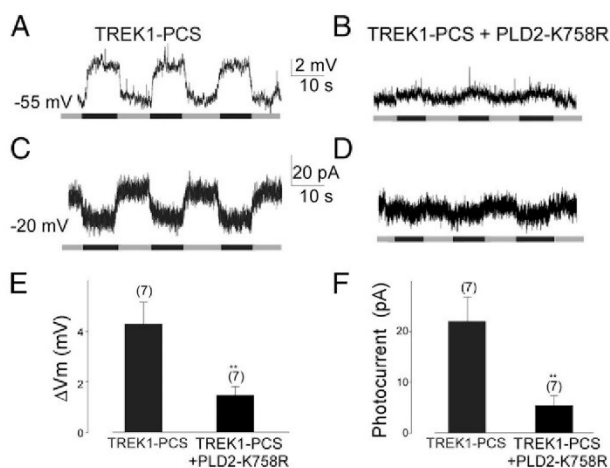


Fig. 6. PLD2-K758R decreases endogenous TREK1 current in hippocampal neurons. (A) Representative current-clamp recording from cultured hippocampal neurons expressing TREK1-PCS shows light modulation of membrane potential. The 380-nm light (in black) leads to channel blockade and depolarization whereas 500 nm light (in gray) unblocks the channels. (B) Same as in A for neurons coexpressing TREK1-PCS and PLD2-K758R. (C) Representative whole-cell voltage-clamp recording from hippocampal neurons expressing TREK1-PCS. (D) Same as in C for neurons expressing TREK1-PCS and PLD2-K758R. (E) Average resting membrane potential modulation induced by alternating illumination of neurons with 500 nm and 380 nm. (F) Average photocurrent induced by alternating illumination of neurons with 500 nm and 380 nm. Student *t* tests (** $P < 0.01$) show the difference between TREK1-PCS and TREK1-PCS coexpressed with PLD2-K758R. The numbers of cells tested are indicated in parentheses.

concentration of PA in a microdomain around the channel to stimulate channel activity (Fig. 5). This mechanism is consistent with a short half-life of PA in the plasma membrane (5). In our model, the regulation of TREK channels by PLD2 is specific not because of the enzymatic product, but because the protein–protein interaction between enzyme and channel allows the channel to be directly coupled to the enzymatic production of PA in a way that is independent of the bulk concentration of PA. Independent pools of phospholipids that govern distinct functions in microdomains have been proposed before (29, 30). Our work provides an illustration of such a case and a mechanism by which it can result in specific regulation of a subset of K_{2P} potassium channels.

In addition to regulation by PLD2, we demonstrated that protracted, but not acute, application of primary alcohols inhibits TREK1 and TREK2. We provide evidence that this effect is mediated by PLD2 rather than direct interaction between alcohols and the channel, in contrast to what has been shown for GIRK channels (31). When exposed to primary alcohols such as ethanol or butan-1-ol, PLD2 catalyzes the production of the biologically inactive phospholipids PEtOH or P-1-BtOH rather than PA. Consistent with the hypothesis that regulation of TREK by alcohols is mediated by removal of tonic stimulation by PLD2, PLD2 is insensitive to secondary alcohols, which were also unable to regulate TREK1 or TREK2. We confirmed this mechanism by showing that primary alcohols also prevent the potentiation effect of PLD2 and that a catalytically inactive mutant of PLD2 is unable to potentiate TREK1 and renders TREK1 insensitive to protracted alcohol treatment. This mechanism may be a general means by which ethanol can induce long-term physiological changes by changing the phospholipid composition of the membrane.

Given the previously demonstrated cross-talk between the GABA_B receptor, GIRK, and TREK and the established role of GABA_B receptors in treatment of alcohol addiction, we wanted to address the possibility that regulation of TREK1 by PLD2, which mediates the effects of ethanol in heterologous systems, occurs natively in mammalian neurons. We tested this in hippocampal neurons using the TREK1-PCS technique (32). We found that displacement of the native, wild-type PLD2 by the catalytically

inactive mutant PLD2-K578R decreased the endogenous TREK1 depolarization or current by fourfold as was also observed for protracted ethanol application. Based on this measurement, we concluded that, at rest, more than 75% of the hippocampal TREK1 current is associated with potentiation of TREK1 by PA. This result indicates that the regulation of TREK1 by PLD2 occurs natively in neurons of the hippocampus and may be important for mediating some of the effects of protracted ethanol consumption and its reversal by GABA_B receptors (33).

In conclusion, association of specific isoforms of an enzyme that generates signaling lipids with select ion channel subtypes can confer specific regulation of those channels. We conjecture that this specificity is due to the high local concentration of the active lipid product near its site of action on the channel, resulting in strong regulation of the bound channel, whereas channels that do not interact with the enzyme are not regulated because the bulk concentration of that lipid does not reach levels that are high enough to act at a distance.

Materials and Methods

Standard molecular biological, biochemical, and electrophysiological techniques were used as described previously (13) and in *SI Appendix*. Briefly, HEK 293T cells were transiently cotransfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Electrophysiology was performed 24–72 h after transfection for HEK 293T and 3–6 d after transfection for hippocampal neurons.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Olivier Soriani and Nicolas Vital for helpful discussion, Michael Frohman and Axel Perianin for PLD2 and PLD1 constructs, Peter A. McNaughton and John D. Scott for shRNA constructs, and Zhu Fu, Benjamin Miraglio, and Sandra Wiese for technical assistance. This work was supported by a grant to G.S. from Action Thématique et Incitative sur Programme-AVENIR (ATIP-AVENIR) funds and the French National Center for Scientific Research, by grants to G.S. and F.L. from the Agence Nationale de la Recherche (Laboratory of Excellence “Ion Channel Science and Therapeutics”, Grant ANR-11-LABX-0015-01), and by support to F.L. from the Fondation pour la Recherche Médicale (Equipe Labellisée FRM 2011) and E.Y.I. from the National Institutes of Health (PN2EY018241). This work was also supported by a National Research Service Award postdoctoral fellowship for M.A.K. (1F32EY022840), by grants to E.Y.I. from the National Science Foundation (FIBR 0623527) and the National Institutes of Health (R01 NS35549), and by support to J.L. from a Chateaubriand Fellowship.

- Foster DA, Xu L (2003) Phospholipase D in cell proliferation and cancer. *Mol Cancer Res* 1(11):789–800.
- Jenkins GM, Frohman MA (2005) Phospholipase D: A lipid centric review. *Cell Mol Life Sci* 62(19–20):2305–2316.
- Oude Weernink PA, López de Jesús M, Schmidt M (2007) Phospholipase D signaling: Orchestration by PIP2 and small GTPases. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 374(5–6):399–411.
- Nanjundan M, Possmayer F (2003) Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284(1):L1–L23.
- Cazzoli R, Shemon AN, Fang MQ, Hughes WE (2006) Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life* 58(8):457–461.
- Yang SF, Freer S, Benson AA (1967) Transphosphatidylolation by phospholipase D. *J Biol Chem* 242(3):477–484.
- Steed PM, Clark KL, Boyer WC, Lasala DJ (1998) Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J* 12(13):1309–1317.
- Fink M, et al. (1998) A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17(12):3297–3308.
- Sandoz G, et al. (2008) Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J Neurosci* 28(34):8545–8552.
- Heurteaux C, et al. (2004) TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23(13):2684–2695.
- Noël J, et al. (2009) The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J* 28(9):1308–1318.
- Heurteaux C, et al. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9(9):1134–1141.
- 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.
- Welch EJ, Jones BW, Scott JD (2010) Networking with AKAPs: Context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol Interv* 10(2):86–97.
- Bockaert J, Perroy J, Bécamel C, Marin P, Fagni L (2010) GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50:89–109.
- Sandoz G, Lesage F (2008) Protein complex analysis of native brain potassium channels by proteomics. *Methods Mol Biol* 491:113–123.
- Sandoz G, et al. (2006) AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J* 25(24):5864–5872.
- Honoré E (2007) The neuronal background K2P channels: Focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8(4):251–261.
- Selvy PE, Lavieri RR, Lindsley CW, Brown HA (2011) Phospholipase D: Enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem Rev* 111(10):6064–6119.
- Kominková V, Magova M, Mojzisořová A, Maleková E, Ondrias K (2001) Effect of ethanol on tracheal potassium channels reconstituted into bilayer lipid membranes. *Physiol Res* 50(5):507–511.
- Brodie MS, Scholz A, Weiger TM, Dopico AM (2007) Ethanol interactions with calcium-dependent potassium channels. *Alcohol Clin Exp Res* 31(10):1625–1632.
- Grissmer S, et al. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45(6):1227–1234.
- Kobayashi T, et al. (1999) Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. *Nat Neurosci* 2(12):1091–1097.
- 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.
- Su W, et al. (2009) 5-Fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI), a phospholipase D pharmacological inhibitor that alters cell spreading and inhibits chemotaxis. *Mol Pharmacol* 75(3):437–446.
- Sung TC, Altschuller YM, Morris AJ, Frohman MA (1999) Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol Chem* 274(1):494–502.
- Sung TC, et al. (1997) Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J* 16(15):4519–4530.
- Zhang X, Li L, McNaughton PA (2008) Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron* 59(3):450–461.
- Simonsen A, Wurmser AE, Emr SD, Stenmark H (2001) The role of phosphoinositides in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13(4):485–492.
- Janmey PA, Lindberg U (2004) Cytoskeletal regulation: Rich in lipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(8):658–666.
- Aryal P, Dvir H, Choe S, Slesinger PA (2009) A discrete alcohol pocket involved in GIRK channel activation. *Nat Neurosci* 12(8):988–995.
- Sandoz G, Levitz J (2013) Optogenetic techniques for the study of native potassium channels. *Front Mol Neurosci* 6:6.
- Boden JM, Fergusson DM (2011) Alcohol and depression. *Addiction* 106(5):906–914.

II.1.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons montré que TREK-1 était spécifiquement inhibé par les alcools primaires mais pas par les secondaires en système d'expression hétérologue mais également dans les tissus natifs.

Nous avons déterminé les mécanismes qui sous tendaient cette inhibition et cela nous a amené à nous intéresser à la régulation de ces canaux par les PLD. Nous avons pu montrer que la PLD2 pouvait augmenter, grâce à la synthèse d'acide phosphatidique, le courant de TREK-1 dans des cellules HEK.

Puis, nous avons étudié la spécificité de cette régulation. Comme dit précédemment, il existe deux isoformes de phospholipase D, la PLD1 et la PLD2, pouvant synthétiser de l'AP. De plus, tous les canaux de la sous-famille TREK sont sensibles à l'AP.

Il s'est avéré que seule la PLD2, et non la PLD1, est capable de potentialiser les canaux TREK-1 et TREK-2 mais pas TRAAK. Nous avons déterminé grâce à des expériences d'immunofluorescences et d'immunoprécipitations que l'enzyme et le canal sont dans le même micro-domaine. Ces résultats nous ont permis de proposer le modèle suivant :

Les canaux TREK-1 (et TREK-2) sont en interaction avec la PLD2 qui va produire un microenvironnement riche en AP qui stimule de façon tonique l'activité du canal inclus. L'augmentation des charges négatives au niveau de la partie interne de la membrane va attirer le domaine C-terminal, induisant le rapprochement de ce domaine avec la membrane plasmique augmentant alors l'activité du canal (Figure 40 A). Dans le cas de TRAAK, le canal est trop loin du site de production pour détecter l'élévation de la quantité d'AP. En présence d'éthanol, la PLD2 ne produit plus de l'AP mais du PEtOH qui est biologiquement inactif et non chargé, cela modifie le microenvironnement lipidique autour du canal, induisant la perte de l'activation tonique du canal. Il en résulte une inhibition de celui-ci.

Ce mécanisme explique comment un lipide régule spécifiquement une protéine membranaire (i.e. par sa synthèse locale). Nous avons pu mettre en évidence que ce mécanisme existe dans un système natif. En effet, la surexpression d'une PLD2 inactive (PLD2-K758R) dans les neurones, en compétition avec la PLD2 endogène pour se lier au canal, induit une sortie du canal du microdomaine riche en AP et ainsi diminution du courant TREK-1 endogène.

II.1.3.1 La régulation des K_{2P} par les phospholipides

Les seconds messagers lipidiques jouent des rôles clés dans la signalisation cellulaire. L'AP produit par la PLD est entre autres impliqué dans la prolifération cellulaire, le trafic vésiculaire, la réorganisation du cytosquelette et la morphogénèse. Très vite, il est apparu que les PLD et l'AP possèdent de nombreux partenaires protéiques les mettant au centre d'un réseau de signalisation (Jang et al., 2012). Ainsi, la PLD2 est très finement régulée grâce à l'intégration de plusieurs signaux provenant de son interaction dynamique avec ses partenaires.

Les canaux potassiques dont les K_{2p} peuvent être régulés de plusieurs manières par les phospholipides. Tout d'abord, il peut y avoir une interaction directe entre le canal et le lipide *via* des sites de fixation, c'est par exemple le cas pour les canaux K_{IR} et le PIP_2 (Hansen, 2015). Ensuite, les propriétés des lipides peuvent modifier la structure de la membrane et induire un changement conformationnel du canal (Haswell et al., 2011; Kung, 2005; Phillips et al., 2009). Enfin, les forces électrostatiques entre les domaines chargés positivement du canal et les têtes chargées négativement de certains phospholipides peuvent induire l'activation du canal (Chemin et al., 2007b; Sandoz et al., 2011). Cependant une question demeure: « Comment un phospholipide peut-il spécifiquement réguler un canal ? »

Le modèle proposé dans ce projet permet d'expliquer comment un second messenger ayant de nombreuses fonctions et une courte demi-vie peut moduler de manière spécifique un canal. Ainsi, la PLD2 régule spécifiquement TREK-1 *via* leur interaction et la production locale d'AP.

Ce modèle diffère de la régulation de TREK-1 *via* le PIP_2 . En effet, alors que le canal peut être activé par une augmentation globale de PIP_2 ou inhibé par sa déplétion, dans le cas de l'AP c'est sa production locale qui entre en jeu. Ainsi, TREK-1 devient un nouveau membre dans le réseau d'interaction de la PLD2. Les mécanismes de cette interaction restent encore à élucider.

Est-ce que cette interaction est dynamique? En effet, dans les neurones d'hippocampe une partie de TREK-1 et TREK-2 semble en constante interaction avec la PLD2. Il serait intéressant d'étudier si cette proportion de canaux peut être modifiée et si oui, dans quelles conditions. De plus, cette proportion est-elle gardée au cours du développement et dans les autres organes? On sait que la partie C-terminale du canal est impliquée dans cette interaction, cependant la séquence exacte d'acides aminés qui est responsable de cette dernière reste inconnue tout comme l'implication possible d'une troisième protéine partenaire.

II.1.3.2 Implication physiologique

Lors de ce projet nous avons pu montrer qu'une application chronique d'éthanol peut inhiber le courant TREK-1. Cela s'explique par le fait qu'une partie des canaux sont en constante interaction avec la PLD2 et activés par celle-ci (Figure 40 A). En présence d'éthanol, la PLD2 n'est plus capable de produire de l'acide phosphatidique: elle synthétise à la place du phosphatidiléthanol. Ce phospholipide n'a pas d'effet biologique, il y a alors destruction du microdomaine riche en AP. On perd ainsi la potentialisation du canal (Figure 40 B).

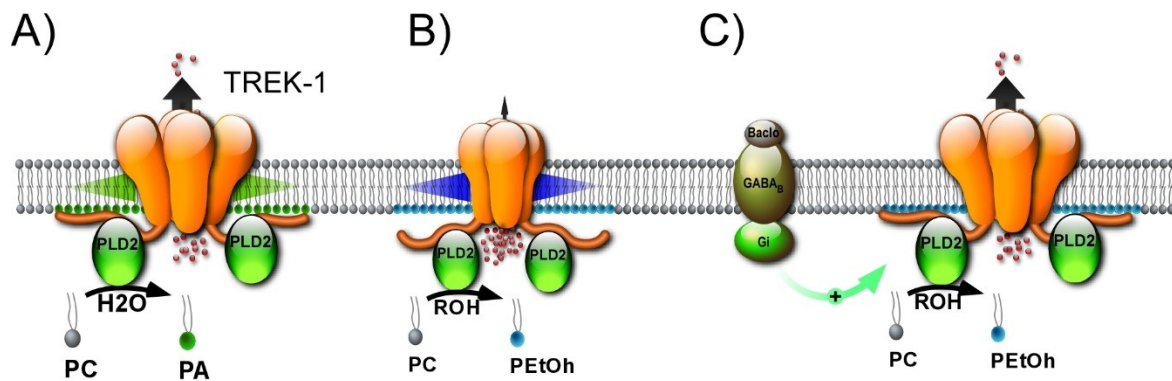


Figure 40: Modèle de la régulation de TREK-1 par la PLD2. (A) TREK-1 interagit avec la PLD2, cette enzyme produit un microenvironnement riche en acide phosphatidique (PA). Ce dernier va potentialiser de manière tonique le canal via le domaine C-terminal du canal. (B) En présence d'alcool primaire (ROH), la PLD2 ne produit plus d'AP mais du phosphatidiléthanol (PEtOh), perturbant alors le microenvironnement riche en AP. Il y a alors dissociation du domaine C-terminal de la membrane et diminution l'activité du canal. (C) Le baclofène via les récepteurs GABA_B pourrait rétablir l'activité de TREK-1.

TREK-1 et TREK-2 sont fortement exprimés dans le cerveau. Leur inactivation sur le long terme par l'alcool pourrait être impliquée dans les différents mécanismes de la prise pathologique d'alcool. Ce mécanisme pourrait aussi expliquer une partie des effets du baclofène sur l'alcoolisme. Cette molécule est utilisée depuis peu dans le traitement de la prise pathologique d'alcool. Or, son mécanisme d'action est encore mal connu. En 2012, il a été montré que cette molécule peut activer le canal TREK-1 *via* les récepteurs GABA_B (Sandoz et al., 2012). Ainsi, une partie de l'efficacité du baclofène pourrait venir de la réactivation de TREK-1 qui a été initialement inhibé par l'alcool (Figure 40 C).

II.1.3.3 Brevet

Ce mécanisme original et sa potentielle implication dans l'addiction nous ont permis de déposer un brevet (Annexe 1). L'invention décrit l'utilisation de TREK-1 et TREK-2 comme cible dans le traitement de l'addiction, ainsi que les molécules pouvant agir dessus. Le but étant de trouver une alternative au baclofène, unique traitement actuel contre la prise de l'alcoolisme. Malgré l'indiscutable effet de cette molécule sur la diminution de l'envie de prise d'alcool, elle induit également plusieurs effets secondaires comme des troubles sensitifs et sensoriels, de l'insomnie, le rétrécissement du champ visuel, De plus l'utilisation massive en peu de temps de cette molécule pour le traitement de l'alcoolisme a mis en évidence les limites de nos connaissances des diverses fonctionnalités du récepteur GABA_B. A cause de cela de nouveaux effets négatifs de ce traitement sont régulièrement observés par les agences de pharmacovigilance (Centre régional de pharmacovigilance de Grenoble, 2013).

Les récepteurs GABA_B sont des récepteurs métabotropiques impliqués dans de nombreuses fonctions. Au niveau cellulaire, ils contrôlent en partie le relargage des neurotransmetteurs comme le glutamate, la dopamine, l'adrénaline et la sérotonine. Ils permettent aussi de contrôler l'excitabilité post- et présynaptique et jouent un rôle dans les changements à long-

terme de la force des synapses (Pinard et al., 2010). Un activateur de ces récepteurs peut potentiellement toucher de nombreuses fonctions. Cela expliquant en outre la grande quantité d'effets secondaires observés avec le baclofène. Afin de diminuer ceux-ci, une alternative au baclofène serait d'utiliser des activateurs de TREK-1. En effet, les canaux TREK étant en aval de l'activation des récepteurs GABA_B, des activateurs de celui-ci induiraient en théorie moins d'effets secondaires.

II.2 ARTICLE 2 : L'hétéromérisation entre les membres de la sous-famille TREK produit une famille diversifiée de canaux potassiques hautement régulée.

II.2.1 Introduction

L'hétéromérisation est un mécanisme communément retrouvé dans la nature permettant d'augmenter la diversité fonctionnelle d'un complexe protéique. Cela est également vrai pour les canaux potassiques. Ceux-ci étant composés de plusieurs sous-unités afin d'être fonctionnels, l'existence d'hétéromères a déjà été décrite pour toutes les familles des canaux potassiques.

II.2.1.1 Problématiques de l'étude des hétéromères chez les K_{2P}

De manière générale, l'hétéromérisation des K_{2P} pourrait avoir un rôle physiologique important. En effet, comme nous l'avons vu tout au long de cette introduction les K_{2P} , et plus précisément les canaux de la sous famille TREK, sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et pathologiques. Il n'est pas impossible que la formation d'hétéromères soit impliquée dans des pathologies. Ces 10 dernières années nous ont montré que l'hétéromérisation des K_{2P} était possible mais que leur étude est complexe. Grâce à la biologie moléculaire et à la stratégie des protéines chimères, l'étude des propriétés fonctionnelles d'un hétéromère est grandement facilité. Cependant c'est la pertinence physiologique qui est difficile à obtenir. En effet, la coexpression dans des systèmes d'expression hétérologue de deux sous-unités différentes induit l'expression à la membrane de trois populations de canaux, l'homodimère de la sous-unité 1, l'homodimère de la sous-unité 2 et l'hétérodimère, s'il y en a un. Or, dans ce cas, comment prouver que les sous-unités peuvent s'assembler pour former un canal fonctionnel ? De plus, la surexpression dans les systèmes hétérologues peut avoir le désavantage de forcer l'hétéromérisation. Il faut donc prouver la formation d'hétéromères dans des conditions physiologiques, dans des tissus natifs.

Ces dernières années ont été développées plusieurs techniques permettant de répondre à cette question. Nous avons, lors de ma thèse, utilisé les approches en molécule unique pour étudier l'hétéromérisation des canaux de la sous famille TREK.

II.2.1.2 Le SiMPull

Cette technique permet d'immunoprécipiter et de visualiser des complexes protéiques au niveau de la molécule unique (Jain et al., 2011). Cette technique nécessite un microscope TIRF (total internal reflection fluorescence) permettant d'examiner une tranche très fine d'un échantillon (<200nm) diminuant ainsi le bruit de fond. Le principe est le même que pour une IP. Grâce à un anticorps spécifique, on précipite une protéine cible et on observe la seconde grâce à une étiquette fluorescente (Green fluorescent protein : GFP) ou un autre anticorps. La précision du microscope TIRF permet d'observer les complexes protéiques de manière unitaire. Dans le cas des hétéromères de K_{2P} , on peut précipiter une sous-unité et observer la présence ou non de la seconde (Figure 41). C'est cette technique que nous avons

choisi pour caractériser l'hétéromérisation des membres de la sous-famille TREK : TREK-1 et TREK-2 et TRAAK.

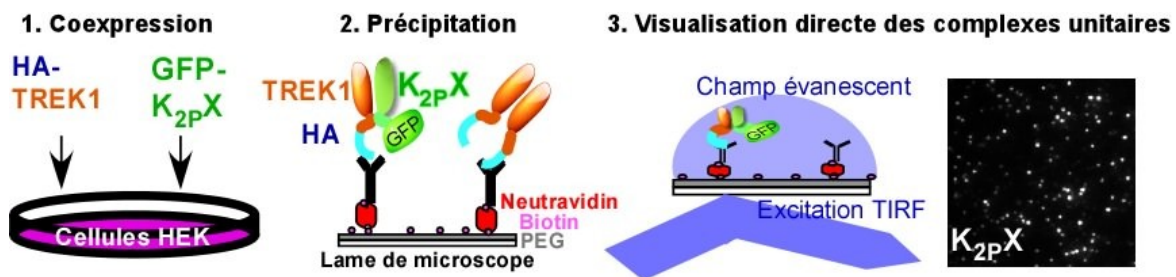


Figure 41: Schéma du principe du SiMPull de TREK-1 avec une autre sous-unité de K_{2p}. (1) La sous-unité TREK-1 étiquetée HA est co-exprimée avec une sous-unité K_{2p} étiquetée GFP dans des cellules HEK. (2) Après lyse des cellules, les complexes sont mis en présence d'anticorps anti-HA préalablement fixés sur une lame de microscope. (3) La présence ou non des sous-unités étiquetées GFP est révélée grâce à un microscope TIRF. L'image de droite montre un exemple de résultats obtenus avec cette technique.

II.2.1.3 Colocalisation à l'échelle de la molécule unique par fluorescence

Cette technique permet de visualiser directement à la membrane des complexes protéiques à l'échelle de la molécule unique dans des conditions d'expressions semblables à celles que l'on peut avoir *in vivo* (Ulbrich and Isacoff, 2008) (Figure 42). Pour cela, les différentes sous-unités du complexe sont étiquetées avec des protéines fluorescentes (ex: GFP, Tomato...) et sont exprimées en faible quantité dans l'ovocyte de xénope. L'utilisation de ce modèle permet de contrôler précisément la quantité d'ARN utilisée et ainsi d'obtenir une concentration de protéines à la membrane proche de celle observée *in vivo*. L'utilisation d'un microscope TIRF et de l'ovocyte de xénope (qui possède un cytosol opaque) permet d'observer avec un bruit de fond faible seulement les complexes protéiques qui sont à la membrane plasmique. La colocalisation de points lumineux de couleur différente correspond à la colocalisation de deux sous-unités différentes (Ulbrich and Isacoff, 2008).

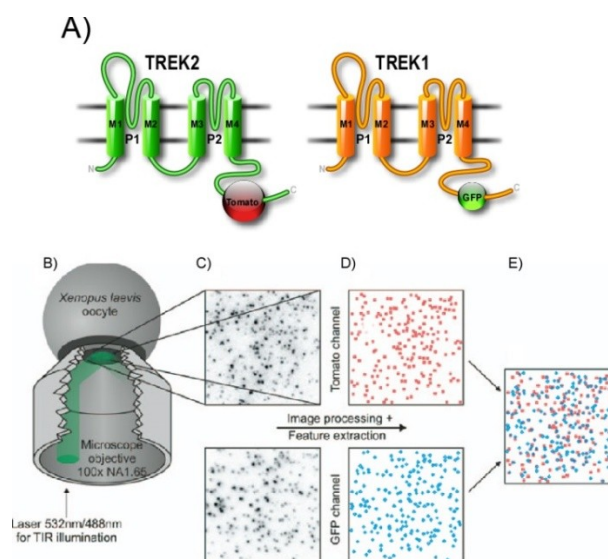


Figure 42: Schéma de la Colocalisation à l'échelle de la molécule unique par fluorescence. (A) Chaque sous-unité étudiée est étiquetée avec une sonde fluorescente différente (ici Tomato et GFP). (B) Après expression d'une faible quantité d'ARN dans l'ovocyte, on observe la fluorescence à la membrane grâce à un microscope TIRF. (C) La fluorescence enregistrée provient

des sondes tomato et GFP et montre l'émission des molécules uniques. (D) La localisation des pics de fluorescence de chaque sonde est extrait puis (E) la superposition des images montre le degré de colocalisation de chaque sous-unité.

II.2.1.4 Le projet

Le but de ce projet fut de déterminer si les membres de la sous-famille TREK peuvent hétéromériser. Lors de ce projet, j'ai surtout contribué aux expériences en *inside out* ainsi que sur la caractérisation du courant de l'hétéromère TREK-1/TRAAK en présence de la PLD2.

II.1.2 Article

Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels

Joshua Levitz^{a,1}, Perrine Royal^{b,c,d,e,1}, Yannick Comoglio^{b,c,d,e}, Brigitte Wdziekonski^{b,c,d,e}, Sébastien Schaub^{b,c,d}, Daniel M. Clemens^a, Ehud Y. Isacoff^{a,f}, and Guillaume Sandoz^{b,c,d,e,2}

^aDepartment of Molecular and Cell Biology and Helen Wills Neuroscience Institute, University of California, Berkeley, CA 94720; ^bInstitute of Biology Valrose (iBV), Université Nice Sophia Antipolis, UMR 7277, 06100 Nice, France; ^cCNRS, iBV, UMR 7277, 06100 Nice, France; ^dINSERM, iBV, 06100 Nice, France; ^eLaboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics, Nice, France; and ^fPhysical Bioscience Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA

Edited by Lily Yeh Jan, University of California, San Francisco, CA, and approved February 26, 2016 (received for review November 17, 2015)

Twik-related K⁺ channel 1 (TREK1), TREK2, and Twik-related arachidonic-acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) form the TREK subfamily of two-pore-domain K⁺ (K_{2P}) channels. Despite sharing up to 78% sequence homology and overlapping expression profiles in the nervous system, these channels show major differences in their regulation by physiological stimuli. For instance, TREK1 is inhibited by external acidification, whereas TREK2 is activated. Here, we investigated the ability of the members of the TREK subfamily to assemble to form functional heteromeric channels with novel properties. Using single-molecule pull-down (SiMPull) from HEK cell lysate and subunit counting in the plasma membrane of living cells, we show that TREK1, TREK2, and TRAAK readily coassemble. TREK1 and TREK2 can each heterodimerize with TRAAK, but do so less efficiently than with each other. We functionally characterized the heterodimers and found that all combinations form outwardly rectifying potassium-selective channels but with variable voltage sensitivity and pH regulation. TREK1-TREK2 heterodimers show low levels of activity at physiological external pH but, unlike their corresponding homodimers, are activated by both acidic and alkaline conditions. Modeling based on recent crystal structures, along with mutational analysis, suggests that each subunit within a TREK1-TREK2 channel is regulated independently via titratable His. Finally, TREK1/TRAAK heterodimers differ in function from TRAAK homodimers in two critical ways: they are activated by both intracellular acidification and alkalization and are regulated by the enzyme phospholipase D2. Thus, heterodimerization provides a means for diversifying functionality through an expansion of the channel types within the K_{2P} channels.

potassium channels | single-molecule fluorescence | leak current | combinatorial diversity | heteromerization

Twik-related K⁺ channel 1 (TREK1), TREK2, and Twik-related arachidonic-acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) are two-pore-domain K⁺ (K_{2P}) ion channels that belong to the TREK channel subfamily and assemble as dimers to produce an inhibitory, outwardly rectifying potassium current. They are not very active under basal conditions but can be dynamically stimulated by a wide range of stimuli, including mechanical stretch (1), heat (2, 3), phospholipids (4–6), and polyunsaturated fatty acids (1, 7). pH is an especially prominent regulator of these channels. Intracellular acidification stimulates both TREK1 and TREK2 (8, 9), whereas TRAAK is stimulated by intracellular alkalization (10). In contrast, extracellular acidification is able to inhibit TREK1 and TRAAK, but activates TREK2 (11). Members of the TREK channel subfamily are also regulated extensively by intracellular scaffolding and signaling proteins (10). We recently characterized the regulation of these channels by the enzyme phospholipase D2 (PLD2) and found that PLD2 associates with TREK1 and TREK2, but not TRAAK, which localizes these channels to a microdomain rich in phosphatidic acid (PA) that tonically activates the channels (5).

TREK1 and TREK2 share ~65% sequence identity, whereas TREK1 and TRAAK share ~40% (12–14). All three subunits are highly expressed throughout the nervous system (12, 14), where they display distinct but overlapping distributions (15). Due to their ubiquitous expression throughout the brain and based on gene KO studies, these channels are thought to play crucial roles in neuroprotection and anesthesia (16), depression (17), and pain perception (10).

Heteromultimerization is a mechanism commonly used to increase the functional diversity of protein complexes. Heteromerization within the K_{2P} channel family was first described in 2002, with the identification of the TASK1–TASK3 complex (18). In this case, the existence of specific sensitivity to ruthenium red allowed the authors to prove the existence of this heteromer functionally. Recently, it has been found that THIK2 requires heteromerization with THIK1 to be active (19). TREK1 has been reported to heteromerize with TWIK-1 in astrocytes (20), but in another study, TREK1 was shown not to heteromerize with TWIK-1 (21). Physiologically, heteromerization of K_{2P} channels can be extremely functionally relevant in neurons. For example, the TASK1–TASK3 heteromer has been shown to contribute to the standing, outward potassium current in cerebellar granule cells (22), which plays a crucial role in apoptosis (20). Despite the increasing interest in heteromerization of K_{2P}

Significance

The two-pore-domain K⁺ (K_{2P}) family of potassium channels provides basal inhibitory tone to regulate resting membrane potential and excitability of neurons. Although physiological and biochemical studies have indicated that distinct members of the family can heterodimerize, the tendency to do so, rather than homodimerize, and the functional effects of heterodimerization are minimally understood. We find that Twik-related K⁺ channel 1 (TREK1) dimerizes as readily with TREK2 as with itself and also with Twik-related arachidonic-acid stimulated K⁺ channel (TRAAK), although less efficiently. The heterodimers combine functional properties of their constituents in terms of three key modes of regulation: by external pH, internal pH, and phospholipase D2. The unique regulatory properties of TREK1-TREK2 and TREK1-TRAAK heterodimers provide insight into the extracellular and intracellular gating mechanisms of K_{2P} channels.

Author contributions: J.L., P.R., Y.C., E.Y.I., and G.S. designed research; J.L., P.R., Y.C., B.W., and G.S. performed research; S.S. and D.M.C. contributed new reagents/analytic tools; J.L., P.R., Y.C., S.S., D.M.C., and G.S. analyzed data; and J.L., P.R., E.Y.I., and G.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

¹J.L. and P.R. contributed equally to this work.

²To whom correspondence should be addressed. Email: sandoz@unice.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1522459113/-DCSupplemental.

channels, it is unknown whether members of the TREK channel subfamily are able to complex with each other and what the functional properties are of these potential heteromers.

Here, we show, using single-molecule fluorescence techniques, that TREK1, TREK2, and TRAAK heterodimerize and that the heterodimers reach the plasma membrane. TREK1-TREK2 heterodimers are functional and produce a current with intermediate amplitude and increased outward rectification compared with TREK1 and TREK2 homodimers. Most interestingly, external pH regulation of the TREK1-TREK2 heterodimer is different from TREK1 and TREK2 homodimers. This heterodimer shows minimal activity at pH 7.4 but is activated by both acidic and alkaline conditions. Mutational and structural analysis of the heterodimer indicate that each subunit has a His pH sensor that operates through intrasubunit electrostatic interactions. We also characterized the TREK1-TRAAK heterodimer and found an intermediate current amplitude and regulation by external pH. Surprisingly, TREK1-TRAAK showed biphasic activation in response to either intracellular acidification or alkalization. Finally, we addressed the ability of the intracellular partner protein PLD2 to regulate the TREK1-TRAAK heterodimer and found that only one TREK1 subunit is sufficient to permit current potentiation.

Results

Single-Molecule Analysis of Coassembly of TREK1, TREK2, and TRAAK Channels in Mammalian Cells. To determine the ability of TREK channels to heteromerize, we used the recently developed single-molecule pull-down (SiMPull) assay (23). SiMPull enables direct visualization of Ab-immobilized individual protein complexes on PEG-passivated coverslips to determine the composition and stoichiometry within individual protein complexes by observing fluorophore bleaching steps.

We first confirmed that TREK channels may be immobilized as dimers in SiMPull by expressing a construct containing an N-terminal HA tag followed by a GFP and then TREK1 (HA-GFP-TREK1) in HEK 293T cells. After 24 to 48 h of expression, cells were lysed and single HA-GFP-TREK1 complexes were pulled down using an anti-HA Ab and imaged with total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy (Fig. 1A). In the absence of the HA Ab, there were no fluorescent spots, confirming the specificity of the Ab and the passivation of the

coverslip (Fig. 1A). The majority of fluorescence intensity trajectories (Fig. 1B) showed two-step bleaching (~53%), with the remaining spots bleaching in one step (~38%) or, occasionally, three or more steps (<10%) (Fig. 1C). This distribution agrees with the binomial distribution for a strict dimer based on an estimated GFP maturation probability of ~75% (24). SiMPull experiments with HA-GFP-TREK2 confirmed that these channels also form strict dimers in mammalian cells (Fig. S1A-C).

We next tested the ability of TREK1 to coassemble with its most closely related homolog, TREK2. We coexpressed HA-TREK1 with GFP-TREK1 or GFP-TREK2 and assessed the ability of HA-TREK1 to coimmunoprecipitate the other channels via the anti-HA Ab. In both cases, HA-TREK1 was able to pull down many fluorescent spots via interactions with the GFP-tagged constructs (Fig. 1D). Importantly, when HA-TREK1 was not coexpressed, neither of the GFP-tagged channels was isolated (Fig. 1D and E). HA-TREK1 pulled down both GFP-TREK1 and GFP-TREK2 with comparable efficiency (Fig. 1E), indicating that TREK1 can coassemble with TREK2 without any clear preference for itself. We also found that HA-TREK2 was able to pull down GFP-TREK2 or GFP-TREK1 with comparable efficiency (Fig. S1D and E).

We also extended this study to TRAAK. Strikingly, HA-TREK1 or HA-TREK2 was able to pull down GFP-TRAAK despite only ~40% sequence identity (Fig. S1F and G). The extent of pull-down of GFP-TRAAK with HA-TREK1 or HA-TREK2 showed weaker efficiency compared with GFP-TREK1 (Fig. S1F-I). We next wondered if TREK1 can coassemble with more distant K₂P channels from another subfamily, such as TASK1 or TASK3, which share ~30% sequence identity with TREK1. The number of detected spots for both GFP-TASK1 and GFP-TASK3 was ~10-fold less than the number of spots detected for GFP-TREK1 (Fig. S2A and B). Consistent with previous studies (18, 25), we found that HA-TASK3 pulled down GFP-TASK3 or GFP-TASK1 with similar efficiency (Fig. S2C).

Because SiMPull was used to isolate complexes at high levels of expression, we wanted to determine whether the same interactions would occur at low protein density exclusively on the plasma membrane.

TREK1 and TREK2 Coassemble and Are Targeted to the Plasma Membrane. To determine the ability of the identified TREK1-TREK2 heterodimer to form on the plasma membrane of living cells, we used single-molecule subunit counting of membrane-bound proteins in *Xenopus* oocytes (24). The assay is performed at low levels of expression, minimizing nonspecific interactions.

We first validated the technique by expressing either a C-terminally GFP-tagged TREK1 (TREK1-GFP) or TREK2 (TREK2-GFP) alone and counting GFP bleaching steps to confirm the dimerization of TREK1 and TREK2. For both TREK1-GFP and TREK2-GFP, ~30% of spots bleached in one step, whereas ~70% bleached in two steps (Fig. 2A and B). This observation agrees well with the binomial distribution expected for a dimer with GFP maturation of ~75% and is consistent with results from SiMPull (Fig. 1).

We next applied a two-color, colocalization-based version of subunit counting to test for coassembly between TREK1 and TREK2. When both TREK1-GFP and a C-terminally tdTomato-tagged TREK2 (TREK2-tdTomato) subunits were coexpressed, some spots were only green, some were only red, and the rest were colocalized spots containing both green and red fluorescence (Fig. 2C). Although background colocalization rates for noninteracting membrane proteins have been estimated at <5% (24), ~25% of the total spots were colocalized in this experiment (114 of 476 spots colocalized). Coexpression of TREK2-GFP and TREK1-tdTomato showed a similar spot distribution with considerable colocalization between the two subunits (105 of 348 spots colocalized). These results confirm that when TREK1 and TREK2 are coexpressed at low densities on the plasma membrane,

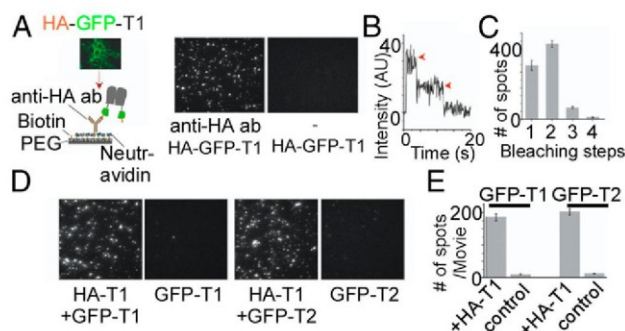


Fig. 1. SiMPull of TREK1 from HEK 293T cells reveals TREK1 homodimers and TREK1-TREK2 heteromers. (A, Left) Schematic of SiMPull of TREK1. HEK 293T cells expressing HA-GFP-TREK1 (HA-GFP-T1) are lysed and then immobilized on a passivated coverslip conjugated to a biotinylated anti-HA Ab. (A, Right) TIRF images of single molecules showing that HA-GFP-TREK1 immobilization is dependent on the anti-HA Ab. (B) Representative trace showing two-step photobleaching (red arrows) of HA-GFP-TREK1. AU, arbitrary units. (C) Summary of photobleaching step distribution for HA-GFP-TREK1. (D) Representative images showing that HA-TREK1 (HA-T1) can pull down GFP-TREK1 (GFP-T1) or GFP-TREK2 (GFP-T2) with comparable efficiency. Controls without HA-TREK1 confirm specificity. (E) Summary of HA-TREK1 pull-down of GFP-TREK1 and GFP-TREK2.

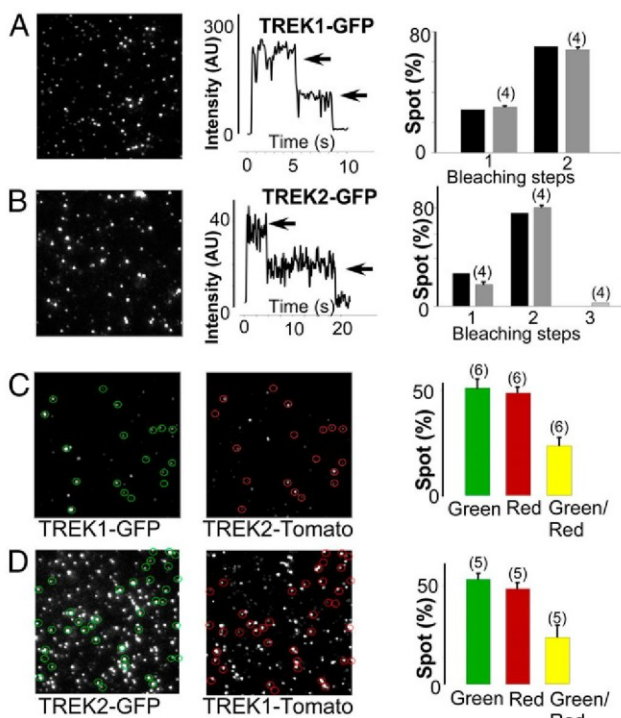


Fig. 2. TREK1 and TREK2 form heterodimers on the plasma membrane of *Xenopus* oocytes. Single-molecule subunit counting of TREK1 (A) and TREK2 (B) confirms strict dimerization. (Left) Images showing the first frame of a movie obtained for TREK1-GFP or TREK2-GFP. (Middle) Representative examples showing the time course of fluorescence photobleaching (gray arrows) from a single spot. (Right) Summary of photobleaching step distribution (gray bars) compared with the predicted distribution for a dimer based on 80% GFP maturation (black bars). (C) Representative TIRF images in the GFP (green) and tdTomato (red) channels for oocytes expressing similar levels of TREK1-GFP and TREK2-TdTomato. A bar graph summarizes the total number of red, green, and colocalized spots (yellow). (D) Similar data to C with TREK2-GFP and TREK1-TdTomato. The numbers of cells tested are indicated in parentheses.

a mix of TREK1 and TREK2 homodimers and TREK1-TREK2 heterodimers exists. We next tested the hypothesis that TREK1-TREK2 heterodimers would have unique functional properties.

Functional Characterization of TREK1-TREK2 and TREK1-TRAAK Heterodimers. To obtain a homogeneous population of heterodimers, we fused TREK1 and TREK2 subunits to produce either a TREK1-TREK2 or TREK2-TREK1 tandem (Fig. 3 A and B). Both tandems formed functional potassium-selective channels (Fig. 3 A and B) with similar basal current amplitudes ($3.13 \pm 0.5 \mu\text{A}$ for TREK1-TREK2 and $3.10 \pm 0.4 \mu\text{A}$ for TREK2-TREK1) that were intermediate between the basal current amplitudes of TREK1 ($5.5 \pm 1 \mu\text{A}$) and TREK2 ($1.8 \pm 0.5 \mu\text{A}$) homodimers (Fig. 3 C and D). TREK1-TREK2 and TREK2-TREK1 had the same channel properties (Fig. 3), indicating that the order of the subunits within the tandem is not important. Importantly, TREK1-TREK1 and TREK2-TREK2 tandem homodimers showed the same amplitude as WT-TREK1 ($P > 0.4$) or WT-TREK2 ($P > 0.2$), respectively, indicating that the tandem construct does not alter basal expression or functional properties (Fig. S3). We also fused TRAAK to TREK1 to produce TREK1-TRAAK and TRAAK-TREK1 tandems that also formed potassium-selective channels with current amplitudes ($1.5 \pm 0.1 \mu\text{A}$ TREK1-TRAAK and $1.4 \pm 0.2 \mu\text{A}$ TRAAK-TREK1) that were intermediate between the amplitudes observed for homodimers of TRAAK ($0.6 \pm 0.1 \mu\text{A}$) and TREK1

($2.4 \pm 0.3 \mu\text{A}$) (Fig. S4). We next examined the functional and regulatory properties of the heterodimeric channels.

TREK1-TREK2 Heterodimers Show Modified Current Rectification. In symmetrical K^+ conditions, TREK-1 and TREK-2 produce outwardly rectifying currents that can be characterized by the ratio $I_{-80\text{ mV}}/I_{+80\text{ mV}}$, which are 0.68 ± 0.05 and 0.58 ± 0.02 for TREK1 and TREK2, respectively. Interestingly, the rectification was stronger for TREK1-TREK2 and TREK2-TREK1 tandem dimers compared with TREK1 and TREK2 homodimers (0.31 ± 0.05 for TREK1-TREK2 and 0.35 ± 0.02 for TREK2-TREK1). In contrast, the TREK1-TRAAK and TRAAK-TREK1 tandem dimers showed the same rectification as TREK1 and TRAAK homodimers (Fig. S4 E and F).

pH Regulation of TREK1-TREK2 and TREK1-TRAAK Heterodimers. For both TREK1 and TREK2, intracellular acidification increases the potassium current by protonating Glu residues on the post-M4 C-terminal domain (Ctd), which controls channel gating through interaction with the plasma membrane (6, 26). Consistent with previous studies, acidifying the intracellular solution from internal pH (pH_i) 7.4 to pH_i 5.5 increased TREK2 current (I_{TREK2}) by 27 ± 5 -fold, whereas I_{TREK1} showed only an 8 ± 3 -fold increase ($P < 0.01$) (Fig. 4 A and B). We tested the TREK2-TREK1 under the same conditions and observed a 6 ± 0.8 -fold current increase, similar to the increase seen in TREK1 ($P > 0.8$) but significantly

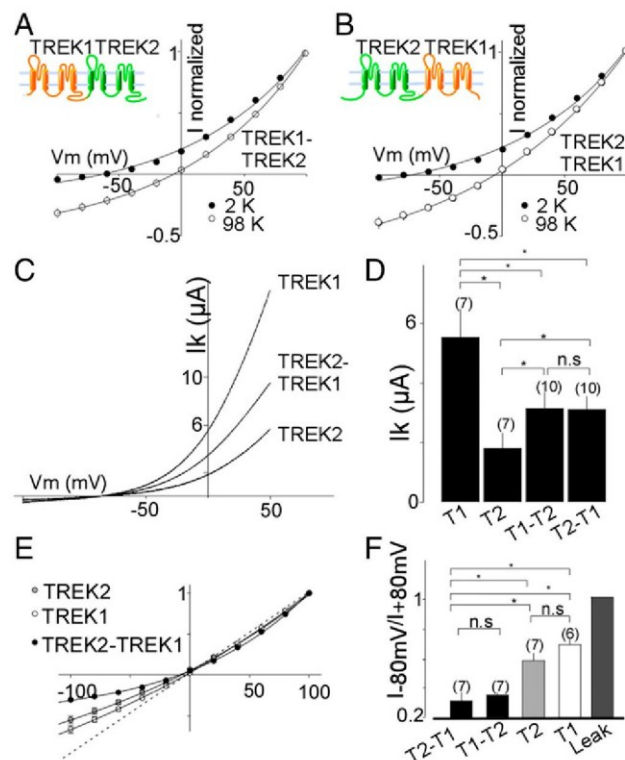


Fig. 3. Functional characterization of TREK1-TREK2 heterodimers. Normalized current-voltage (*I*-*V*) curves for TREK1-TREK2 (T1-T2) (A) or TREK2-TREK1 (T2-T1) (B) tandem dimers in the presence of two concentrations of external potassium (2 mM and 98 mM). (C) Representative traces showing TREK1 (T1), TREK2 (T2), and TREK2-TREK1 currents elicited by voltage ramps (from -100 to 50 mV, 1-s duration). (D) Summary of average current amplitudes. (E) Normalized *I*-*V* curves for TREK1, TREK2, and TREK2-TREK1 obtained in symmetrical potassium conditions (98 mM). (F) Bar graph representing the ratio of mean current recorded at -80 and $+80$ mV. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. Student's *t* test ($*P < 0.05$). *I*_k, potassium current; n.s., not significant; *V*_m, membrane potential.

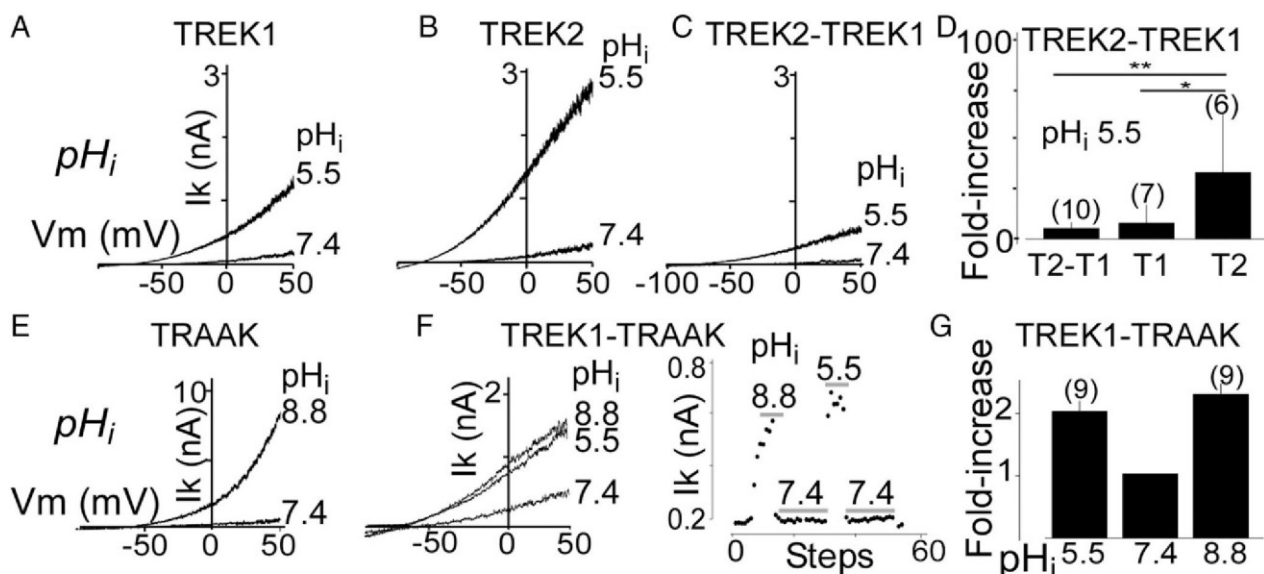


Fig. 4. Regulation of TREK family heterodimers by intracellular pH (pH_i). Representative traces showing the effect of intracellular acidification on TREK1 (T1) (A), TREK2 (T2) (B), and TREK2-TREK1 tandem heterodimers (T2-T1) (C). (D) Bar graph summarizing the current fold increases induced by a pH_i shift from 7.4 to 5.5. Representative traces showing the effect of changes in pH_i on TRAAK homodimers (E) and TREK1-TRAAK tandem heterodimers (F). An example of the response to dynamic changes in pH_i for TREK1-TRAAK is shown in F. Currents were elicited by voltage ramps from -100 to 50 mV, 1-s duration, 1 step per 5 s. (G) Bar graph summarizing the increase in current induced by pH_i shift from 7.4 to either 5.5 or 8.8 for TREK1-TRAAK. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. Student's *t* test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

less than what was observed for TREK2 ($P < 0.01$) (Fig. 4 C and D). Unlike TREK1 and TREK2, TRAAK is activated by intracellular alkalinization (Fig. 4E). Using TREK1-TRAAK tandem dimers, we found that these heterodimers are weakly activated by both increases and decreases in pH_i (Fig. 4 F and G).

We next investigated the regulation of TREK heterodimers by external pH (pH_o). Despite the high degree of sequence identity (~70%), TREK1 and TREK2 display an opposite regulation by pH_o (11): TREK1 is inhibited by acidification and activated by alkalinization, whereas TREK2 is activated by acidification and inhibited by alkalinization. TREK1-TREK2 showed unique regulation by pH_o . Acidification from pH_o 8.5–7.4 induced a rapid and large decrease in TREK1-TREK2 current amplitude ($51 \pm 6\%$) that was similar to TREK1 ($71 \pm 6\%$) (Fig. 5A). Further acidification from 7.4 to 6.5 induced a $34 \pm 9\%$ increase in TREK1-TREK2 current, similar to what was observed for TREK2 ($49 \pm 11\%$) (Fig. 5A). We titrated the pH and found that the heterodimer produces its lowest activity at physiological pH 7.4 and that either acidification or alkalinization leads to an increase in current (Fig. 5 B and C). In contrast to TREK2, TRAAK is inhibited by external acidification, but more weakly than TREK1 (11). As expected, TREK1-TRAAK was inhibited by external acidification but the observed inhibition was intermediate in amplitude between what is seen in TREK1 (highly sensitive) and TRAAK (poorly sensitive) (Fig. 5D).

We next probed the atypical regulation of the TREK1-TREK2 heterodimer to determine the mechanism of pH-sensing. TREK1 and TREK2 channels have a homologous pH sensor: a conserved His located in the first extracellular loop [H126 in TREK1 and H151 in TREK2 (11)]. Mutation of both His to either Ala or Lys within the tandem TREK2-TREK1 heterodimer abolished pH sensitivity (Fig. 6 A and B), confirming their roles in pH sensing. Within a heterodimer, mutation of only the pH sensor (H151) of the TREK2 subunit did not fully abolish pH sensitivity but, instead, converted the channel into a TREK1-like “mode”: The tandem heterodimer was potentiated by $68 \pm 13\%$ or $40 \pm 9\%$ by alkalinization from pH 7.2–8 and inhibited by $53.5 \pm 5\%$ and $48 \pm 16\%$ by acidification from pH 7.4–6.5 for H151A and H151K, respectively (Fig. 6 A and B). In addition, H151K, which mimics

the protonated state, increased the basal current of the heterodimer by $39 \pm 7\%$, whereas H151A, which mimics the deprotonated state, induced a basal current decrease of $38.5 \pm 15\%$ (Fig. 6C). This measurement is in agreement with the effects of the H151K mutation ($58 \pm 12\%$ increase in basal current) and

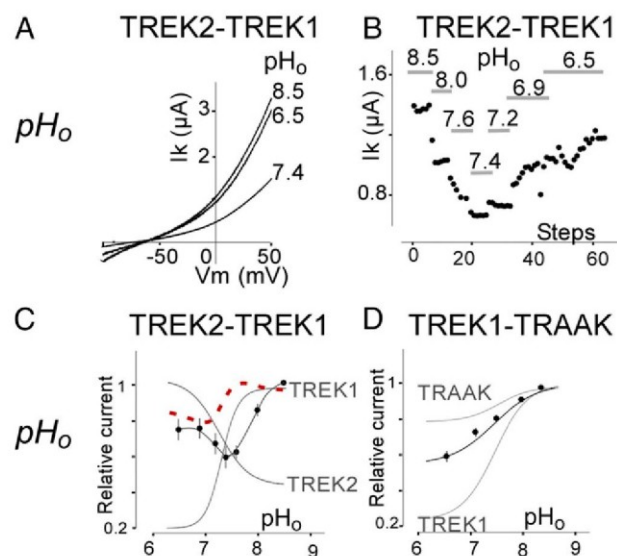


Fig. 5. Regulation of TREK family heterodimers by extracellular pH. (A) Representative traces showing the effect of changes in extracellular pH (pH_o) on TREK2-TREK1 tandem heterodimers. Currents were elicited by voltage ramps (from -10 to 50 mV, 1-s in duration). (B) Representative example of dynamic regulation of TREK2-TREK1 tandem heterodimers by changes in pH_o . (C) pH_o dependence of TREK2-TREK1 tandem heterodimers (black) compared with TREK2 and TREK1 (gray) homodimers. The linear sum of the pH_o dependence of the TREK1 and TREK2 homodimers is shown as a dotted red line. (D) pH_o dependence of TREK1-TRAAK tandem heterodimers (black) compared with TREK1 and TRAAK homodimers (gray).

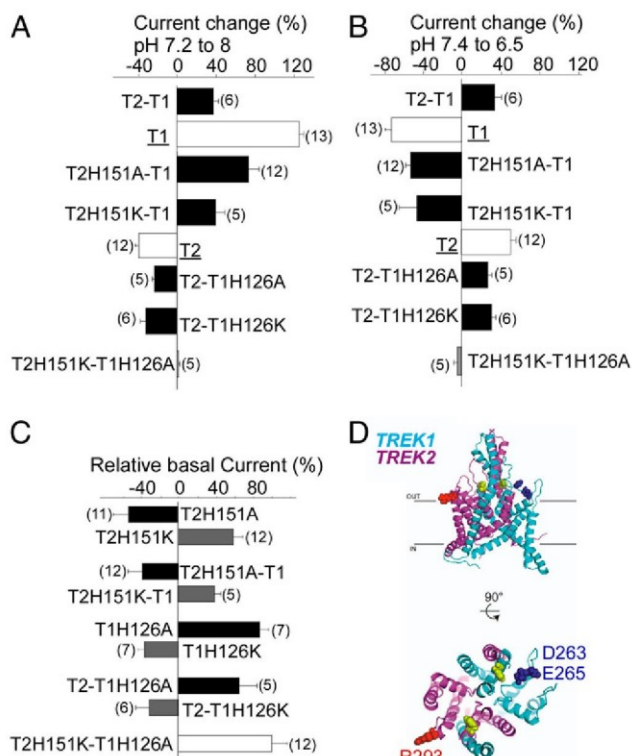


Fig. 6. Mechanism of Ph_o sensitivity of TREK2-TREK1 heterodimers. (A) Bar graph showing the percentage of current at pH 8 relative to pH 7.2 for TREK1 (T1), TREK2 (T2), TREK2-TREK1 (T2-T1), and TREK2-TREK1 (T2-T1) mutants. (B) Bar graph showing the percentage of current at pH 7.4 relative to pH 6.5. (C) Bar graph showing the current amplitude of TREK2 (T2) mutants relative to TREK2, TREK1 (T1) mutants relative to TREK1, and TREK2-TREK1 (T2-T1) mutants relative to TREK2-TREK1. (D) Structural model of TREK1-TREK2 heterodimers showing His pH sensors (yellow). The proposed negatively charged interacting residues of TREK1 (cyan) are shown in blue, and the proposed positively charged interacting residues of TREK2 (magenta) are shown in red.

the H151A mutation ($30 \pm 14\%$ decrease in basal current) in TREK2 homodimers (Fig. 6C). Together, these data indicate that the His pH sensors within a heterodimer control basal current and the pH_o response in a subunit-autonomous manner. In agreement with this interpretation, mutation of the pH sensor of the TREK1 subunit within the TREK1-TREK2 heterodimer (H126A or H126K) resulted in TREK2-like pH-sensing behavior (Fig. 6A and B). Consistent with what was seen for TREK1 homodimers, heterodimers with TREK1-H126A showed increased basal current by $68 \pm 15\%$, whereas tandem heterodimers with TREK1-H126K showed decreased basal current by $31.8 \pm 5\%$ (Fig. 6C).

To visualize how extracellular His within the first loop of TREK channels may control the sensitivity to pH_o , we used crystal structures of TREK2 (27) and TREK1 to build a model of the TREK1-TREK2 heterodimer. The model shows that charged residues within the second extracellular loop (negatively charged E265 and D263 in TREK1 and positively charged R293 in TREK2), which were previously identified as potential electrostatic interaction partners (11), are indeed positioned to interact with the His, and that these interactions occur within a subunit (Fig. 6D). This proximity likely explains why pH sensing can operate independently in each subunit.

Regulation of TREK1-TRAAK Heterodimers by PLD2. We recently described how, in both TREK1 and TREK2, interaction of the

intracellular Ctd with the PA-producing enzyme PLD2 results in PA-dependent tonic activation (5). Despite its sensitivity to PA, TRAAK is not regulated by PLD2 because it does not form a channel-enzyme complex. We asked if the TREK1-TRAAK heterodimer, which presumably contains only one PLD2 binding site in the Ctd of the TREK1 subunit, can be regulated by PLD2 coexpression. TRAAK-TREK1 and TREK1-TRAAK tandems were potentiated by coexpression of PLD2 to a similar level as seen for TREK1 (Fig. 7), suggesting that only one Ctd is sufficient to bind PLD2 and produce enough PA for tonic activation.

Discussion

In this study, we analyzed the ability of members of the TREK channel subfamily of K_{2P} channels to coassemble and found that TREK1, TREK2, and TRAAK are able to heteromerize: TREK1 coassembles with TREK2 as efficiently as it does with itself and also assembles with TRAAK, although less efficiently. In contrast, TREK1 coassembles poorly with members of other K_{2P} subfamilies, such as TASK channels. The overlapping expression patterns in the mouse brain (7, 28) suggest that heterodimers may form in native tissue. We found that the functional properties of heterodimers are distinct from the functional properties of the homodimers, thereby providing an added mechanism for functional diversity.

Extracellular acidification has previously been shown to inhibit homodimers of TREK1 and activate homodimers of TREK2 (11). We found that TREK1-TREK2 heterodimers display a unique blend of pH sensitivity, with activation by both extracellular acidification and alkalization, which results in an unusual property of minimal activity at physiological pH_o . Mutations in the pH sensor of the TREK1 subunit of the heterodimer converted the TREK1-TREK2 heterodimeric channel into TREK2-like pH-sensing, whereas mutations in the pH sensor of the TREK2 subunit converted the heterodimeric channel into TREK1-like pH-sensing. Together, these findings reveal that the pH sensors operate individually within each subunit.

Interestingly, extracellular acidification or mutation of the pH sensor His in the first extracellular loop to Lys boosts current in TREK1 and inhibits current in TREK2, whereas mutation to Ala has the opposite effects (11). Moreover, the opposite effect in TREK1 and TREK2 can be accounted for by the opposite charges of the interacting charged residues in the second extracellular loop: two acidic residues in TREK1 vs. a basic residue in TREK2. These characteristics are consistent with the model that repulsion between the external loops stabilizes the open state of the channel, whereas attraction between the external loops stabilizes the closed state of the channel (11). How could such interactions between the first and second external loops be communicated to the internal gate of the channel? An answer is

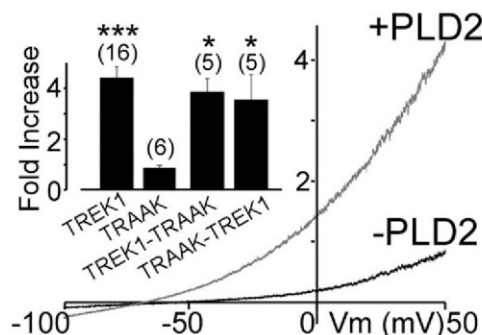


Fig. 7. Potentiation of TREK1-TRAAK heterodimers by PLD2. Representative traces showing effects of PLD2 coexpression on TREK1-TRAAK. (Inset) Summary of current potentiation by coexpression of PLD2. The numbers of cells tested are indicated in parentheses. Student's *t* test (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$).

suggested by the location of the charged residues in the second external loop just “above” the fourth transmembrane helix, which has been shown to serve as an intracellular gate in K_{2P} channels (29–31), implying an activation rearrangement that propagates through the helix to the intracellular gate.

It is interesting to consider how the proposed pH sensor to gate linkages in the two subunits combines their influences on the gate. Given the opposite effect of titration of the sensor His in TREK1 and TREK2, one would have expected that the effect of pH would have been blunted in the TREK1-TREK2 heterodimer and perhaps that the effect on one of the subunits (e.g., TREK1, which is potentiated at alkaline pH by more than TREK2 is inhibited) would have dominated, leaving a reduced and monotonic effect of pH in the TREK1-TREK2 heterodimer. However, what we observed instead was that the TREK1-TREK2 heterodimer was activated at both low and high pH. This nonlinear influence on gating suggests a more complex process that may involve intersubunit interactions.

TREK subfamily channels are also modulated by pH_i . Whereas TREK1 and TREK2 homodimers are activated by intracellular acidification (32), TRAAK is activated by intracellular alkalization (27). We find that TREK1-TRAAK heterodimers are activated by both increases and decreases in pH_i . This regulation indicates that, as seen with the extracellular His pH_o sensors, the C termini of TREK and TRAAK individually sense pH and influence gating.

The unique sensitivity of TREK1-TREK2 and TREK1-TRAAK heterodimers to changes in extracellular or intracellular pH, respectively, may have important physiological consequences. Deviation from resting pH is associated with heavy activity or metabolic load, as well as with pathological states. Neurons coexpressing TREK1 and TREK2 or TREK1 and TRAAK may form heterodimers that are activated by both acidification and alkalization. This coassembly may endow TREK channels with a neuroprotective function, whereby pH deviation from physiological values increases

the hyperpolarizing outward potassium current to prevent potentially damaging excitation from spreading throughout the network.

In contrast to the complex subunit regulation by pH, we found that another class of regulation, by PLD2, operated in a simple manner. PLD2 has been shown recently to regulate TREK1 and TREK2, but not TRAAK, with specificity defined by the ability of PLD2 to bind to the C termini of TREK1 and TREK2, but not TRAAK (5). We find that TREK1-TRAAK heterodimers are regulated by PLD2 with a similar potency to TREK1, indicating that a channel needs only one PLD2-compatible C-terminal domain to bind PLD2. Thus, whereas the two C termini respond individually to changes in pH_i and the two pH_o sensors respond individually to changes in external pH, a single PLD2 binding site in one C-terminal domain is sufficient to anchor the enzyme, which then can create a PA-rich domain.

Methods

Standard molecular biological, biochemical, and electrophysiological techniques were used as described previously (5) and (SI Methods). Electrophysiology was performed 24–72 h after transfection for HEK 293T cells and 24–48 h after injection for *Xenopus laevis* oocytes. For SiMPull experiments, coverslips were prepared as described (23). Single molecules were imaged using a 488-nm argon laser on a TIRF microscope with a 60 \times objective (Olympus). For subunit counting with *Xenopus laevis* oocytes, oocytes were enzymatically treated with hyaluronidase (1 mg/mL; Sigma) and neuraminidase (1 unit/mL; Sigma) for 15 min at 4 °C and manually devitalized to enable close contact of the oocyte's plasma membrane to the coverslip.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank S. Bharill, M. Ulbrich, and O. Soriani for technical assistance and helpful discussion. The work was supported by a grant (to G.S.) by the Action Thématique et Incitative sur Programme-AVENIR (ATIP-AVENIR) funds and the French National Center for Scientific Research, as well as by grants (to G.S.) from the Fondation NRJ-Institut de France, Agence Nationale de la Recherche (ANR) (Laboratory of Excellence “Ion Channel Science and Therapeutics,” Grant ANR-11-LABX-0015-01), and ANR Dynaselect (Grant ANR-14-CE13-0010); by grants (to E.Y.I.) from the National Science Foundation (Grant IOS-1451027) and NIH (Grant R01NS35549); and by a Chateaubriand fellowship (to J.L.).

- Patel AJ, et al. (1998) A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K^+ channel. *EMBO J* 17(15):4283–4290.
- Maingret F, et al. (2000) TREK-1 is a heat-activated background K^+ channel. *EMBO J* 19(11):2483–2491.
- Kang D, Choe C, Kim D (2005) Thermosensitivity of the two-pore domain K^+ channels TREK-2 and TRAAK. *J Physiol* 564(Pt 1):103–116.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (2000) Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K^+ channels TREK-1 and TRAAK. *J Biol Chem* 275(14):10128–10133.
- Comoglio Y, et al. (2014) Phospholipase D2 specifically regulates TREK potassium channels via direct interaction and local production of phosphatidic acid. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(37):13547–13552.
- Sandoz G, Bell SC, Isacoff EY (2011) Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6):2605–2610.
- Fink M, et al. (1998) A neuronal two P domain K^+ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J* 17(12):3297–3308.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, Lazdunski M, Honoré E (1999) Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem* 274(38):26691–26696.
- Kim Y, Gnatenco C, Bang H, Kim D (2001) Localization of TREK-2 K^+ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pH_i . *Pflügers Arch* 442(6):952–960.
- Noël J, Sandoz G, Lesage F (2011) Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 5(5):402–409.
- Sandoz G, Douguet D, Chatelain F, Lazdunski M, Lesage F (2009) Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(34):14628–14633.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, Lazdunski M (2000) Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K^+ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem* 275(37):28398–28405.
- Bang H, Kim Y, Kim D (2000) TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K^+ channel family. *J Biol Chem* 275(23):17412–17419.
- Fink M, et al. (1996) Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K^+ channel. *EMBO J* 15(24):6854–6862.
- Talley EM, Solorzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss DA (2001) Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci* 21(19):7491–7505.
- Heurteaux C, et al. (2004) TREK-1, a K^+ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J* 23(13):2684–2695.
- Heurteaux C, et al. (2006) Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat Neurosci* 9(9):1134–1141.
- Czirják G, Enyedi P (2002) Formation of functional heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 two-pore domain potassium channel subunits. *J Biol Chem* 277(7):5426–5432.
- Blin S, et al. (2014) Tandem pore domain halothane-inhibited K^+ channel subunits THK1 and THK2 assemble and form active channels. *J Biol Chem* 289(41):28202–28212.
- Woo DH, et al. (2012) TREK-1 and Best1 channels mediate fast and slow glutamate release in astrocytes upon GPCR activation. *Cell* 151(1):25–40.
- Plant LD, et al. (2010) One SUMO is sufficient to silence the dimeric potassium channel K2P1. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(23):10743–10748.
- Lauritzen I, et al. (2003) K^+ -dependent cerebellar granule neuron apoptosis. Role of task leak K^+ channels. *J Biol Chem* 278(34):32068–32076.
- Jain A, et al. (2011) Probing cellular protein complexes using single-molecule pull-down. *Nature* 473(7348):484–488.
- Ulbrich MH, Isacoff EY (2007) Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat Methods* 4(4):319–321.
- Lauritzen I, et al. (2005) Cross-talk between the mechano-gated K_{2P} channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep* 6(7):642–648.
- Honoré E (2007) The neuronal background K_{2P} channels: Focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci* 8(4):251–261.
- Kim Y, Bang H, Gnatenco C, Kim D (2001) Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K^+ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflügers Arch* 442(1):64–72.
- Sandoz G, et al. (2008) Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K^+ channel expression and trafficking. *J Neurosci* 28(34):8545–8552.
- Brohawn SG, del Mármol J, MacKinnon R (2012) Crystal structure of the human K_{2P} TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K^+ ion channel. *Science* 335(6067):436–441.
- Dong YY, et al. (2015) K_{2P} channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* 347(6227):1256–1259.
- Bagriantsev SN, Peyronnet R, Clark KA, Honoré E, Minor DL, Jr (2011) Multiple modalities converge on a common gate to control K_{2P} channel function. *EMBO J* 30(17):3594–3606.
- Honoré E, Maingret F, Lazdunski M, Patel AJ (2002) An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K^+ channel TREK-1. *EMBO J* 21(12):2968–2976.
- Reiner A, Arant RJ, Isacoff EY (2012) Assembly stoichiometry of the GluK2/GluK5 kainate receptor complex. *Cell Reports* 1(3):234–240.
- Sali A, Blundell TL (1993) Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 234(3):779–815.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K (1996) VMD: Visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14(1):33–38, 27–28.

II.1.3 Discussion

Nous avons mis en évidence que TREK-1, TREK-2 et TRAAK peuvent co-assembler et former des hétéromères. Néanmoins, ils n'ont pas tous la même probabilité de s'associer entre eux. TREK-1 et TREK-2 ont autant de possibilité de former des homomères que des hétéromères. TRAAK quant à lui possède une probabilité plus faible de former un hétéromère avec TREK-1 ou TREK-2 que de former un homomère. Cette étude a aussi permis de mettre en évidence que TREK-1 n'était pas capable de s'associer avec les canaux TASK.

Enfin grâce à la technique de colocalisation fluorescente à l'échelle de la molécule unique nous avons pu mettre en évidence l'hétéromérisation de ces canaux à la membrane plasmique lors d'expressions semblables à celle retrouvée *in vivo*.

Etant donné que les canaux TREK-1, TREK-2 et TRAAK peuvent s'assembler dans des conditions normales d'expression et que leurs patterns d'expression sont chevauchant dans différents organes (Fink et al., 1998; Sandoz et al., 2008), nous pouvons émettre l'hypothèse que l'hétéromérisation a lieu dans les tissus natifs. Les nouvelles caractéristiques de ces canaux permettent ainsi une régulation plus fine de certaines fonctions physiologiques.

La fonction acquise la plus remarquable est la nouvelle sensibilité de TREK-1-TREK-2 pour le pH extracellulaire. TREK-1 est activé par l'alcalinisation extracellulaire alors que TREK-2 est activé par l'acidification de celui-ci. L'hétéromère quant à lui, a une sensibilité intermédiaire. A la fois l'acidification et l'alcalinisation sont capables d'activer ce canal. Ainsi son activité minimale se situe à pH physiologique.

Les expériences de structure-fonction ont permis de mettre en évidence que les senseurs du pH des différentes sous-unités de l'hétéromère agissent de manière indépendante les unes des autres. De plus, ces résultats sont en accord avec le modèle proposant que la répulsion des boucles extracellulaires stabilise le canal en position "ouvert" alors que leur attraction stabilise le canal en position "fermé" (Sandoz et al., 2009). Cependant une question demeure: comment l'interaction entre la première et la seconde boucle extracellulaire peut-elle communiquer avec la porte interne du canal ? La localisation des résidus chargés de la seconde boucle répond en partie à cette question. Ces résidus se trouvent juste "au-dessus" du segment M4. Il a été montré que cette hélice *via* des réarrangements pouvait contrôler la porte interne du canal (Bagriantsev et al., 2011; Dong et al., 2015). Cependant, il est intéressant de considérer comment les sous-unités combinent leur influence sur la porte interne. Etant donné les effets opposés du pH extracellulaire sur TREK-1 et TREK-2, on aurait pu s'attendre à ce que l'effet du pH extracellulaire (pH_{ext}) soit amoindri dans l'hétéromère ou encore que l'une des sous-unités prenne le dessus sur l'autre. Or, cette étude a montré l'inverse: les deux mécanismes se complètent, laissant penser que l'influence des sous-unités sur la porte interne est plus complexe qu'il n'y paraît.

Les canaux TREK sont également modulés par le pH intracellulaire. TREK-1 et TREK-2 sont activés par la diminution du pH intracellulaire (pH_{int}) alors que TRAAK est activé par l'augmentation du pH_{int} . Tout comme pour la régulation par le pH_{ext} , l'hétéromère TREK-1-

TRAAK possède les caractéristiques des deux sous-unités. Ainsi, les domaines C-terminal peuvent discerner le pH de manière indépendante.

Les modifications du pH intra- ou extracellulaire sont des indicateurs d'états anormaux de la cellule. Ces états sont dus à des activités métaboliques importantes ou encore à des pathologies comme l'inflammation. La sensibilité particulière des hétéromères TREK-1-TREK-2 ou TREK-1-TRAAK fait d'eux de parfaits senseurs de ces états. Dans les neurones, la présence d'hétéromères pourrait avoir un rôle neuroprotecteur. En effet, un changement de pH quel qu'il soit, active le canal et diminue ainsi l'excitabilité cellulaire.

Nous avons montré qu'un autre type de régulation peut être modifié lors de l'hétéromérisation. L'hétéromère TREK-1-TRAAK peut ainsi être modulé par la PLD2. Nous avons montré dans le projet précédent que seuls TREK-1 et TREK-2 étaient potentialisés par cette enzyme. Cette régulation spécifique est due à l'interaction entre la PLD2 et le domaine C-terminal des canaux TREK-1 ou TREK-2. Nous savons que TRAAK est sensible à l'acide phosphatidique et qu'il peut être régulé par la PLD2 lorsque l'interaction est forcée. L'hétéromérisation entre TREK-1 et TRAAK permet de forcer cette interaction. Ainsi, lors de cette étude nous avons mis en évidence qu'un seul domaine C-terminal est suffisant pour interagir avec l'enzyme. Cette dernière produit alors un microdomaine riche en acide phosphatidique qui potentialise l'hétéromère TREK-1-TRAAK.

L'hétéromérisation permet donc au canal d'avoir au moins une partie des partenaires protéiques de chaque sous-unité, chacune apportant sa propre régulation et permettant d'augmenter la diversité fonctionnelle du canal.

II.3 ARTICLE 3 : Une toxine mycobactérienne induit une analgésie dans l'ulcère de Buruli en ciblant la voie de signalisation de l'angiotensine.

II.3.1 Introduction

La compréhension et le traitement de la douleur sont aujourd'hui de véritables enjeux de santé publique. En effet, rien qu'en Europe, 1 personne sur 5 souffre de douleurs chroniques (Breivik et al., 2006) et son coût pour la société est estimé selon l'EFIC (The European Federation of IASP chapter) supérieur à 300 milliards d'euros. Au regard de cette situation, la quantité de traitements disponibles reste faible, avec peu de familles différentes et souvent avec des effets secondaires importants (Borsook et al., 2014).

Dans ce contexte, il est important de développer de nouveaux traitements. Pour cela deux pistes peuvent être suivies. Tout d'abord, une meilleure compréhension des mécanismes de la douleur permettant de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ensuite, la possibilité de se tourner vers la nature pour trouver de nouvelles molécules originales ayant été élaborées au cours de l'évolution. Par exemple la mambalgine, est un nouvel analgésique potentiel découvert chez un serpent, le Mamba noir (Diochot et al., 2012).

II.3.1.1 Une meilleure compréhension des mécanismes: Implication des canaux ioniques / K_{2P}

La douleur est un signal d'alarme permettant d'avertir un organisme d'une lésion tissulaire actuelle ou probable. La sensation douloureuse induite par plusieurs *stimuli* (thermiques, chimiques, mécaniques,...) est transmise des tissus périphériques au système nerveux central *via* les neurones des ganglions de la racine dorsale ou des ganglions trigéminaux (Waxman and Zamponi, 2014; Waxman et al., 1999). Ces *stimuli* sont détectés *via* des canaux ioniques ou des récepteurs. L'identification des canaux impliqués dans ce mécanisme fut une pierre angulaire dans la compréhension des mécanismes de la douleur (Julius and Basbaum, 2001; Wood et al., 2004).

Dans ce contexte les canaux potassiques jouent un rôle déterminant dans l'excitabilité neuronale (Tsantoulas and McMahon, 2014) et plus particulièrement dans la régulation de celle-ci. Les K_{2P} permettent d'hyperpolariser les neurones les rendant moins excitables. Dans le cas d'inflammation ou de douleurs neuropathiques certains K_{2P} peuvent être inhibés, augmentant ainsi l'excitabilité des neurones et la sensation douloureuse. La sous-famille TREK ne fait pas exception et tous ses membres sont impliqués dans la sensation douloureuse C'est surtout grâce aux différentes souris *Knock-Out* que l'implication de ces canaux dans ce mécanisme a pu être déterminée. Leur rôle est essentiellement la prévention de l'hyperalgésie thermique (Li and Toyoda, 2015; Noël et al., 2009; Pereira et al., 2014). L'hyperalgésie correspondant à une sensibilité excessive à un *stimulus* douloureux.

II.3.1.2 L'Ulcère de Buruli et le mycolactone: Une régulation originale de la douleur

Nous nous intéressons ici à une toxine bactérienne: la mycolactone. Celle-ci est produite par *Mycobacterium ulcerans* responsable de l'ulcère de Buruli. Cette maladie tropicale a la particularité de causer d'importantes lésions de la peau sans douleurs. Pendant longtemps, cette absence de douleur fut associée à une destruction du système nerveux périphérique (Goto et al., 2006). Or, les études *in vivo* qui ont permis cette affirmation, ont été réalisées sur des animaux présentant des lésions déjà très avancées, avec une destruction massive des tissus cutanés contenant les terminaisons nerveuses (Goto et al., 2006).

Lors de ma thèse j'ai contribué à un projet étudiant le mécanisme d'action de la mycolactone, l'hypothèse étant que cette toxine module l'influx nerveux, sans destruction préalable des neurones. J'ai participé à ce projet en réalisant la pharmacologie des canaux K_{2P} impliqués dans le mécanisme d'action de la mycolactone.

II.3.2 Article

Mycobacterial Toxin Induces Analgesia in Buruli Ulcer by Targeting the Angiotensin Pathways

Estelle Marion,^{1,2,13} Ok-Ryul Song,^{1,2,3,13} Thierry Christophe,^{2,13} Jérémie Babonneau,² Denis Fenistein,² Joël Eyer,⁴ Frank Letourmel,⁴ Daniel Henrion,⁵ Nicolas Clere,⁶ Vincent Paille,⁵ Nathalie C. Guérineau,⁵ Jean-Paul Saint André,⁷ Philipp Gersbach,⁸ Karl-Heinz Altmann,⁸ Timothy Paul Stinear,⁹ Yannick Comoglio,¹⁰ Guillaume Sandoz,¹⁰ Laurence Preisser,¹¹ Yves Delneste,¹¹ Edouard Yeramian,^{12,14} Laurent Marsollier,^{1,2,11,14,*} and Priscille Brodin^{2,3,14,*}

¹Inserm Avenir, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

²Inserm Avenir, Institut Pasteur Korea, 16, Daewangpangyo-ro 712 Beon-gil, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-400, Korea

³Inserm U1019, CNRS UMR8204, Université de Lille - Nord de France, Institut Pasteur de Lille, Center for Infection and Immunity, 1, rue du Professeur Calmette, 59000 Lille, France

⁴UPRES - EA 3143, Laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

⁵Inserm 1083, CNRS UMR6214, Laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

⁶Inserm U1063, Stress Oxydant et Pathologies Métaboliques, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

⁷Laboratoire d'anatomie pathologique, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

⁸ETH Zürich, Department of Chemistry and Applied Biosciences, Institute of Pharmaceutical Sciences, Wolfgang-Pauli-Str. 10, 8093 Zürich, Switzerland

⁹Department of Microbiology and Immunology, University of Melbourne, Parkville 3010, Australia

¹⁰Inserm Avenir, Laboratories of Excellence, Ion Channel Science and Therapeutics Nice, Institut de Biologie Valrose, iBV, Inserm U1091, CNRS UMR7277, Université Nice Sophia Antipolis, Parc Valrose, 06108 Nice, France

¹¹Equipe 7, Inserm U892, CNRS U6299, Université et CHU, CRCNA, 4 rue Larrey 49, 933 Angers, France

¹²Unité de Bioinformatique Structurale, CNRS UMR3528 Institut Pasteur, 75015 Paris, France

¹³Co-first authors

¹⁴Co-senior authors

*Correspondence: laurent.marsollier@inserm.fr (L.M.), priscille.brodin@inserm.fr (P.B.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.040>

SUMMARY

Mycobacterium ulcerans, the etiological agent of Buruli ulcer, causes extensive skin lesions, which despite their severity are not accompanied by pain. It was previously thought that this remarkable analgesia is ensured by direct nerve cell destruction. We demonstrate here that *M. ulcerans*-induced hypoesthesia is instead achieved through a specific neurological pathway triggered by the secreted mycobacterial polyketide mycolactone. We decipher this pathway at the molecular level, showing that mycolactone elicits signaling through type 2 angiotensin II receptors (AT₂Rs), leading to potassium-dependent hyperpolarization of neurons. We further validate the physiological relevance of this mechanism with in vivo studies of pain sensitivity in mice infected with *M. ulcerans*, following the disruption of the identified pathway. Our findings shed new light on molecular mechanisms evolved by natural systems for the induction of very effective analgesia, opening up the prospect of new families of analgesics derived from such systems.

INTRODUCTION

Mycobacterium ulcerans is the causative agent of Buruli ulcer. The incidence of BU is increasing worldwide, ranking third among mycobacterial diseases (Sizaire et al., 2006; Wansbrough-Jones and Phillips, 2006). In most cases, *M. ulcerans* infection is associated with a subcutaneous nodule that is typically painless (Asiedu et al., 2000; Johnson et al., 2005). If untreated, the disease progresses to necrotic lesions and open wounds, for which, ultimately, the only solution is heavy surgical intervention. The absence of pain in the lesions, in the early infection stages, often results in delayed care seeking. Elucidation of the precise mechanisms of hypoesthesia in Buruli ulcer is of great importance, not only for prophylactic purposes but also to improve our fundamental understanding of the modes of action of natural analgesics.

It was thought until now that analgesia in Buruli ulcer is achieved by direct destruction of nerve bundles, in particular through the action of mycolactone (En et al., 2008; Goto et al., 2006), a polyketide toxin secreted by *M. ulcerans* which is essential for bacterial virulence, immune modulation, and host colonization (Coutanceau et al., 2005; George et al., 1999; Guenin-Macé et al., 2011; Marsollier et al., 2005; Marsollier et al., 2007; Simmonds et al., 2009; Torrado et al., 2010). However, several pieces of evidence contradict the hypothesis attributing hypoesthesia induced by *M. ulcerans* to nerve degeneration. As



a matter of fact, nerve damage is observed only in the late stages of infection, whereas painlessness usually occurs in the early stages (En et al., 2008; Goto et al., 2006). Here, we seek to elucidate the mechanisms underlying the very effective induction of analgesia in Buruli ulcer. We first reassess in detail the hypothesis of nerve degeneration using a mouse model of *M. ulcerans* infection. We show in this model that the induction of analgesia by mycolactone is not accompanied by nerve degeneration. Rather mycolactone induces cell hyperpolarization, which we show is triggered by the angiotensin II receptor (AT₂R). We further dissect the underlying pathway showing that mycolactone signaling involves cyclooxygenase 1 (COX-1) and prostaglandin E₂, resulting in the activation of TRAAK potassium channels. Foremost, we validate in vivo the relevance of this signaling pathway in the mycolactone-mediated hypoesthesia induced by *M. ulcerans*, showing that blockade of AT₂R restores sensitivity to pain in mice.

RESULTS

M. ulcerans Induces Hypoesthesia in Early Stages of Edema

We developed a mouse model to assess the relationship between hypoesthesia and nerve degeneration under low dose conditions of *M. ulcerans* infection. *M. ulcerans* was injected into the footpads of mice, and hypoesthesia was monitored with the pain receptive tail-flick assay at different time points. Under such conditions, mice exhibited redness at day 35 postinfection and edema at day 45. At both time points, hypoesthesia was observed in *M. ulcerans*-infected animals, with a significant tail-flick latency of 4 s, as compared to noninfected controls (Figure 1A). Histological analysis of mice inoculated with *M. ulcerans* expressing GFP showed the presence of bacilli around the inoculation site, both in the stages of redness and edema (Figure 1B). On the other hand, no GFP bacilli were found in nervous tissue, either in glial cells or in axons. Macroscopic and ultrastructural inspection revealed no signs of nerve degeneration (Figures 1C and 1D). Similarly, extensive examination of more than 480 Remak fibers showed no differences between *M. ulcerans*-infected footpads and noninfected controls at the level of cytoskeletal cell composition, organization of microtubules and filaments, structure of unmyelinated axons, or size of Schwann cell nuclei (Figures 1C and 1D). Finally, no obvious anomalies were observed in the infected footpads at the level of myelinated or C-fibers involved in sensory information transmission (Besson, 1999; Griffin and Thompson, 2008). Taken together, these results demonstrate that hypoesthesia in *M. ulcerans* infection is not attributable to nerve degeneration, at least in this mouse model.

We next investigated the effect of direct inoculation of purified mycolactone on hypoesthesia and nerve damage. Used as control, lidocaine induced a transient hypoesthesia in our model shortly after injection. Low doses of mycolactone produced sustained analgesia for up to 2 days (Figure 1E). Noticeably, nociceptive abilities were recovered after 8 days. Under these conditions, as for *M. ulcerans*-infected samples, we performed a close inspection of Remak fibers observing again that the Schwann cells were intact (Besson, 1999; Hoeijmakers et al., 2012). Thus, mycolactone injection alone is sufficient to produce

hypoesthesia without nerve damage. Further, we also tested chemically synthesized mycolactone, to rule out possible effects of contaminants in our preparation of purified mycolactone. The synthetic mycolactone induced the same level of reversible hypoesthesia as the purified toxin, with the same concentrations and application durations. This result clearly demonstrates that the observed analgesic effect is attributable to the mycolactone toxin (Figure 1E).

Mycolactone Induces Hyperpolarization of Neurons

With this hypothesis of nerve degeneration to account for hypoesthesia ruled out, it was natural to ask whether mycolactone could instead produce hypoesthesia by interfering with relevant neural transmission pathways. To this end, we examined the effect of mycolactone on membrane potential in neurons derived from PC12 cells using the patch-clamp technique in the current-clamp mode. Upon local and continuous application, mycolactone induced a slowly developing cell hyperpolarization. As compared to vehicle-treated neurons, an average decrease of -10 mV in the membrane potential was observed after 20 min of incubation with purified mycolactone at subtoxic doses (Figures 2A, 2B, and Figure S1 available online). The same membrane potential change was also observed with the synthetic mycolactone, at the same concentration. After removal of the toxin, the cells recovered their resting membrane potential, displaying signal intensities similar to those before addition of toxin. As a matter of fact, such reversibility of the effect of mycolactone also supports the conclusion relative to the absence of neuronal damage (Figure 2C). For enhanced characterization, we next developed an image-based phenotypic assay based on the monitoring of mycolactone-induced hyperpolarization. More specifically, neurons were loaded with the voltage-sensitive fluorescent bis-oxonol probe DiSBAC₂(3) (Dall'Asta et al., 1997) and exposed to mycolactone. In this assay, the cell fluorescence decreased within 20 min (Figure 2C), with the cells exhibiting the same type of slowly developed hyperpolarization as that observed by electrophysiological recordings of membrane potentials. Accordingly we decided to monitor the effect of toxin at 20 min in the following experiments. For image-based quantification of the samples, the DiSBAC₂(3) signal was recorded before addition of toxin and 20 min after ([T1int] and [T2int], respectively), and the intensity ratio [T2int/T1int] was calculated (Figures S2A and S2B). Such quantification of the samples showed that 40% of the signal intensity was lost in the presence of 0.175 ng/ml mycolactone (Figure 2D). Hyperpolarization is typically associated with K⁺ channels, and we checked that such channels were involved in the mycolactone-induced hyperpolarization. To this end we treated cells with the two K⁺ channel blockers tetraethylammonium (TEA) and barium chloride (BaCl₂). As shown in Figures 2E and 2F, TEA and BaCl₂ abolished the mycolactone-mediated hyperpolarization demonstrating that it is mediated by K⁺ efflux. At this level, the analgesic action of mycolactone appears to share common features with the nonopioid analgesic flupirtine, which also hyperpolarizes neurons by activation of K⁺ channels (Szelenyi, 2013). Furthermore, the K⁺ channels involved in the mycolactone-mediated hyperpolarization appear to be sensitive to TEA and BaCl₂ only at relatively high concentrations (above 10 mM and 1 mM, respectively),

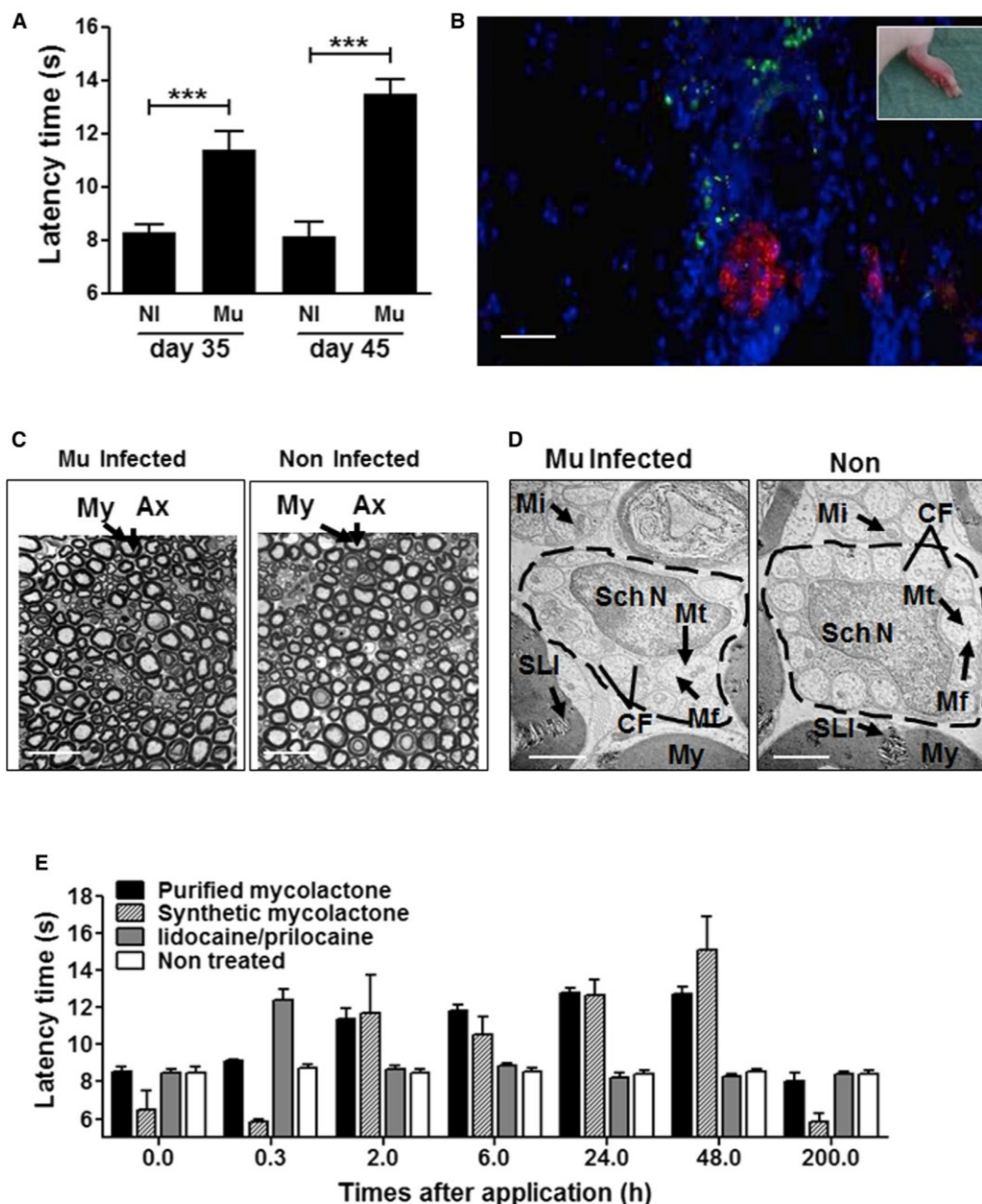


Figure 1. Absence of Pain in Buruli Ulcer Lesions Results from a Direct Anesthetic Effect of Mycolactone

(A) The nociceptive reflex was quantified using a tail-flick unit. Mice infected with *M. ulcerans* (Mu) showed redness at day 35 and edema at day 45. NI: noninfected group (n = 5 redness stage mice, n = 5 edema mice). Mean ± SD, ***p < 0.0001, Student's t test.

(B) Histological analysis of cutaneous tissue from the footpad inoculated with *M. ulcerans*-GFP (green). Blue, DAPI; red, β3 tubulin staining with Texas red-conjugated anti-β3 tubulin antibody. Representative image from a set of slides of tissues from five mice (30 slides per tissue) that were analyzed at days 35 and 45 after *M. ulcerans*-GFP inoculation. Scale bars, 100 μm. Inset: Picture of the corresponding mouse footpad.

(C and D) Observation at the optical microscope (C) and ultrastructural (D) (electron microscope) levels of sciatic nerves innervating the infected (left) and noninfected (right) footpads of animals at either the redness or the edema stage of injury. The black dotted line circumscribes a Remak bundle. Ax, axon; Mi, mitochondria; Sch N, Schwann cell nucleus; Mt, microtubule; Mf, microfilament; My, myelin; CF, C-Fiber; SLI, Schmidt-Lanterman incisures. Scale bars, 40 μm (C), and 5 μm (D).

(E) The nociceptive reflex was measured in mice after injection of 5 μg of purified mycolactone (black bars), synthetic mycolactone (hatched bars), lidocaine and prilocaine anesthetics (gray bars), or absolute ethanol alone (vehicle control) (white bars). Mean ± SEM.

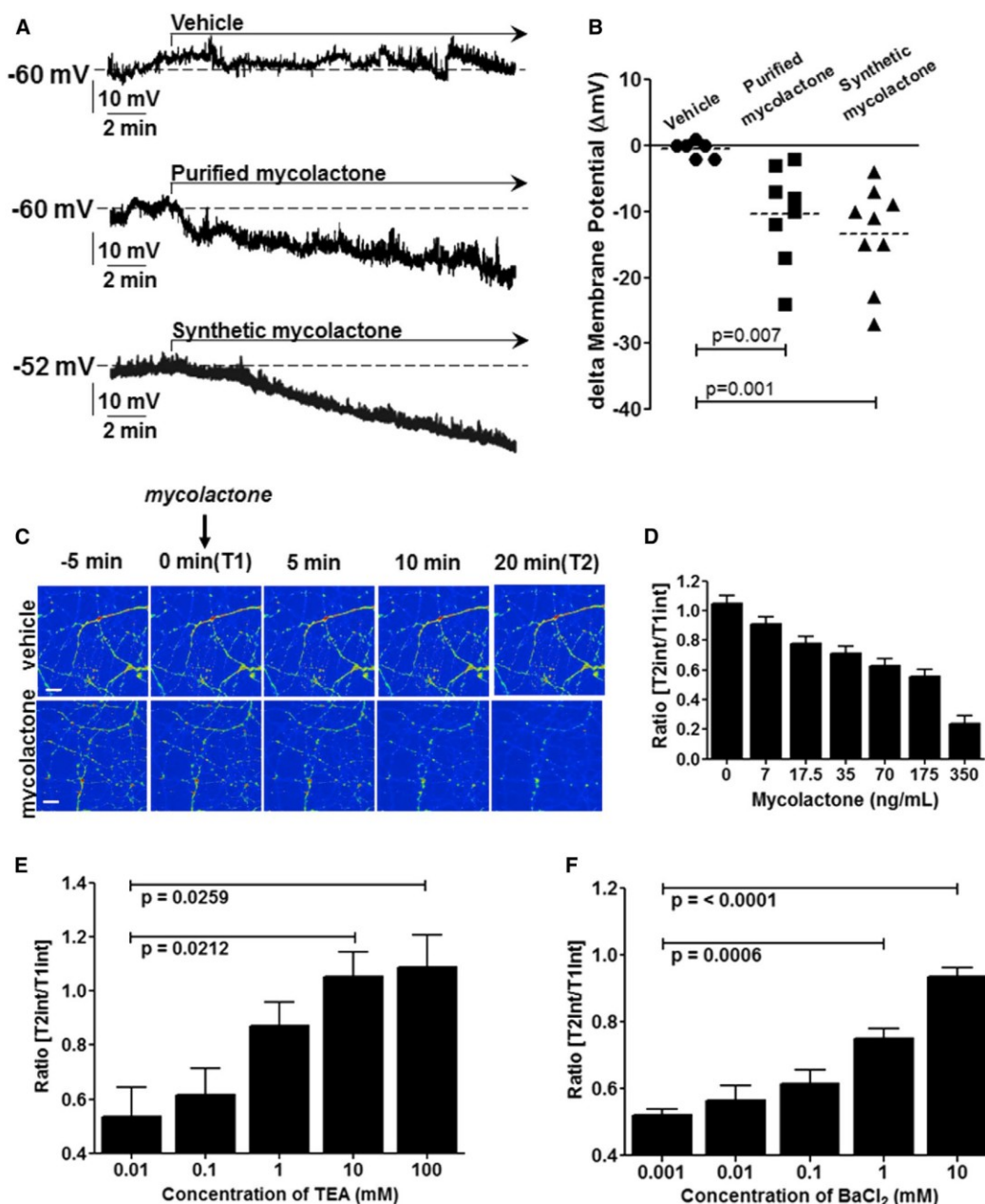


Figure 2. Mycolactone Provokes Hyperpolarization via K⁺ Channels in Murine Primary Neurons

(A) Representative chart recordings of the membrane potential of PC12 cells challenged either by ethanol (vehicle), purified mycolactone or synthetic mycolactone.

(B) Pooled data illustrating a 10 mV-hyperpolarization triggered by continuous application of purified mycolactone or synthetic mycolactone for 10–20 min. Dotted line: mean.

(C) Photomicrographs of hippocampal neurons loaded with bis-oxonol (DiSBAC₂(3)) and inoculated with mycolactone at 350 ng/ml or with ethanol (vehicle) at various times. Scale bars, 100 μ m.

(D) Quantification of the fluorescence intensity expressed as the ratio of bis-oxonol (DiSBAC₂(3)) signal intensity at 20 min (T2int) to that at 0 min (T1int). Mean \pm SD.

(E and F) Effect of two K⁺ channels blockers, tetraethylammonium (TEA) and barium chloride (BaCl₂) on the cell hyperpolarization caused by mycolactone. Mean \pm SEM.

suggesting that they belong to the K2P channel family (Noël et al., 2011; Sandoz et al., 2012).

Identification of AT₂R as the Target Receptor for Mycolactone Involved in Cell Hyperpolarization

To further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the action of mycolactone we sought to identify its target receptor involved in the K⁺-mediated hyperpolarization. To this end, we adapted the assay above to the large-scale screening of a siRNA library targeting 8,000 different host genes. Macrophage-like cells of the Raw267.4 cell line were used in this screening as they are efficiently silenced by siRNAs (Carralot et al., 2009). We first checked that the effect of mycolactone on hyperpolarization in Raw267.4 cells is the same as in neurons (Figure S2). For the screening experiments cells were first incubated with siRNA and then loaded with DiSBAC₂(3) immediately before the addition of mycolactone. A decreased intensity ratio was observed after the addition of toxin to cells that had been incubated with nontarget (scrambled) siRNAs (Figure S3). The most significant hits (roughly 1% of the total) were selected from the primary screen, leading to 34 siRNA-targeted genes upon retesting. In this set, only three genes appeared to be associated with receptors, namely *il23r*, *icam1*, and *agtr2* (Table S1). With this respect, it is noticeable that no genes encoding opioid receptors, common target of analgesics, were found among the most significant hits from the siRNA screen. Whereas ICAM1 and IL23R, belonging respectively to the immunoglobulin and interleukin receptor families, do not appear to be associated in any—direct—known way with nociceptive pathways, the angiotensin II type 2 receptor (AGTR2 or AT₂R) represented a favorable candidate to account for the observed analgesia effects. This receptor has been reported recently, in a completely different context, to be specifically involved in nociception in the course of experiments testing the effects of the AT₂R chemical antagonist PD123,319 (Anand et al., 2013). Accordingly we focused our subsequent investigations on AT₂R receptors. First, we checked that silencing AT₂R led to a high ratio value comparable to that of the scramble control in the absence of toxin (Figure 3A). We then proceeded to investigate in detail the potential role of AT₂R as a mediator of mycolactone-mediated hyperpolarization, seeking to fully characterize and decipher the associated pathway. As a first direct characterization, we showed that neurons isolated from AT₂R knockout (AT₂R-KO) mice (Hein et al., 1995) were not hyperpolarized upon addition of mycolactone, with no observed decrease in DiSBAC₂(3) signal (Figure 3B). Furthermore, we assessed *in vitro* the binding affinity of the mycolactone toxin to human AT₂R, which displays 95% amino acid sequence identity with murine AT₂R. Binding affinity of mycolactone to AT₂R was determined in a radioligand competition assay using the agonist [¹²⁵I] CGP42,112A (Pelegri-da-Silva et al., 2005). Mycolactone was able to inhibit the AT₂R agonist with an IC₅₀ value of 3 μg/ml (Figure 3C). We further analyzed the expression of AT₂R in our settings and found that AT₂R was expressed in mouse footpad. In this assay, infection with *M. ulcerans* did not change significantly the level of expression of AT₂R (Figure S4), showing that AT₂R is not upregulated after infection. To further pinpoint the causal role of mycolactone in cell hyperpolarization via AT₂R receptors we performed two

additional assays. First we showed that the AT₂R-selective antagonist PD123,319 inhibits mycolactone-induced hyperpolarization in neuronal cells (Figure 3D). In addition, it is known that AT₂R is a G protein-coupled receptor, which couples selectively to pertussis toxin (PTX)-sensitive G_{i2} and G_{i3} proteins (Kang et al., 1994; Summers and Gelband, 1998). Upon preincubation of the cells with the G- α inhibitor PTX (Figure 3E), we showed that mycolactone-mediated hyperpolarization was abolished, thus demonstrating that G- α proteins are involved in mycolactone-induced AT₂R signaling. In conclusion, inhibition of mycolactone signaling in absence of AT₂R was demonstrated through three different approaches, relying on chemical inhibition and genetic knockdown as well as genetic knockout. We further checked whether mycolactone could also signal through AT₁R, as is the case for angiotensin II. As a matter of fact mycolactone displayed binding affinity to the human AT₁R similar to that measured for AT₂R (Figure S5). Accordingly, we tested the effect of mycolactone in an AT₁R functional assay whereby cytosolic Ca²⁺ ion mobilization is measured in HEK293 cells expressing AT₁R. No effect of mycolactone was observed in this assay, up to 20 μg/ml, showing that despite its binding on the receptor mycolactone does not trigger AT₁R activation. Confirming this result, we showed that mycolactone signaling was abolished in neurons from mice KO for AT₂R (Clere et al., 2010; Hein et al., 1995) not impaired for AT₁R expression, thus excluding a role for AT₁R in mycolactone-induced hyperpolarization.

AT₂R Induces Cell Hyperpolarization via Cyclooxygenase Pathway

To dissect the mycolactone-induced pathway at the molecular level, we performed a series of additional analyses of our siRNA data, complemented by the screening of a chemical library of inhibitors with known targets. Based on the identification of the AT₂R target above, the rationale in this two-pass screening approach was to reanalyse the siRNA data, with a significantly relaxed threshold, in order to further identify relevant genes involved in the underlying pathway seeking notably to bridge the gap between the AT₂R-input and K⁺ channels-output levels. In this second-pass screening the analyses were conducted in the light of information available in the literature, concerning various alternative pathways associated with the activation of AT₂R. As a matter of fact, it was documented in the literature that modulation of K⁺ currents by AT₂R signaling can follow several different intracellular pathways (Nouet and Nahmias, 2000). The primary reported pathway involves the protein PTPN6-SHP1, which becomes phosphorylated upon AT₂R activation (Bedecs et al., 1997). In our cellular model, it was possible to exclude this pathway for AT₂R-mediated signaling because addition of mycolactone did not result in any notable variation in the amount of phosphorylated SHP1 (Figure S6). Another reported pathway for AT₂R modulation of K⁺ currents involves signaling through activation of phospholipase A2 (PLA₂) and release of arachidonic acid (AA) (Lauritzen et al., 2000). We showed that the AT₂R-mediated signaling of mycolactone is consistent with this pathway. More precisely, we were able to dissect in detail the triggering of this pathway by mycolactone and to assess the effects of the enzymes involved in the

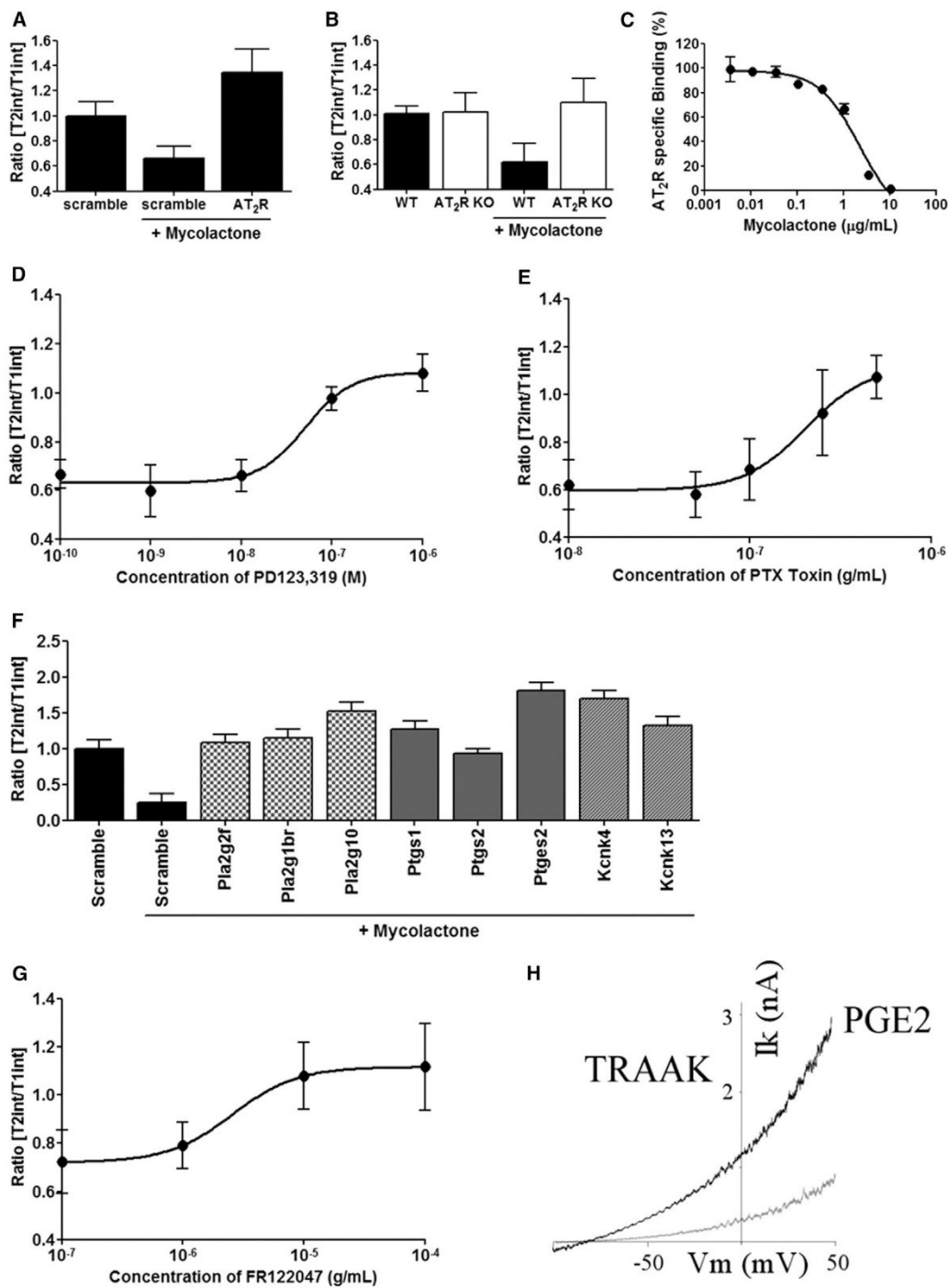


Figure 3. AT₂R is Targeted by Mycolactone

(A) Fluorescence ratio of Raw267.4 cells treated either with siRNA targeting AT₂R or with scrambled siRNA, and further loaded with bis-oxonol (DiSBAC₂(3)) before incubation with mycolactone. The ratio is normalized to that of the scrambled siRNA control. Mean ± SD.

(B) Fluorescence ratio of neurons from AT₂R deficient (AT₂R KO) or wild-type (WT) mice; the neurons were loaded with bis-oxonol (DiSBAC₂(3)) before incubation with mycolactone. Mean ± SD.

(legend continued on next page)

biosynthesis and metabolism of AA. We found that mycolactone-induced hyperpolarization was inhibited upon silencing of several PLA₂ homologs that mediate the release of AA from membrane phospholipids (Figure 3F). Mycolactone signaling was also impaired upon silencing of *cox-1* (*ptgs1*), which converts AA into prostaglandins (Fletcher et al., 2010) (Figure 3F). We showed that inhibition of PTGS1 by the chemical inhibitors FR122047 and Piroxicam abolished mycolactone-mediated hyperpolarization (Figure 3G). As Piroxicam is a nonselective COX inhibitor, we further wanted to investigate the possible involvement of COX-2 in this pathway. Accordingly, we tested COX-2 inhibition either by silencing the expression of *ptgs2* or by using COX-2 selective inhibitors (Dup-697 and NS398). In both cases, we observed no effects in our assay, thus ruling out a putative role of COX-2 signaling in our scheme.

Refined Characterization of the K⁺ Channels Subfamily

Beyond the detailed characterization of the molecular pathway between AT₂R-input and K⁺ channels-output, the second-pass reanalysis of our siRNA primary screen further allowed refining the characterization of the K⁺ channels in terms of subfamily assignment. More precisely, such reanalysis allowed to pinpoint two possible candidate subfamilies to which the potassium channels involved in the mycolactone-induced hyperpolarization belong, namely KCNK4 (TRAAK) and KCNK13 (THIK1) from the K2P channels family (Figure 3F). Channels from the K2P family function as regulatory hubs for the generation of negative resting membrane potentials and therefore they constitute appropriate final targets of the signaling pathway involved in the mycolactone-induced hyperpolarization. As high concentrations of either barium or TEA reversed the mycolactone-induced hyperpolarization, we wanted to investigate the ability of BaCl₂ and TEA to block the activity of TRAAK. We showed that TRAAK is sensitive to TEA and BaCl₂ with an IC₅₀ of 7 ± 2 mM and 0.5 ± 0.1 mM, respectively (Figure S7). These IC₅₀ values are in good agreement with the concentration that provokes an inhibition of the mycolactone-induced hyperpolarization (Figures 2E and 2F). Accordingly, we asked the question as to which mediator was involved in TRAAK activation. Based on the evidence above concerning the involvement of the cyclooxygenase pathway in the AT₂R-induced cell hyperpolarization, it was natural to consider first a possible direct role for arachidonic acid, known to activate TRAAK channels. However, we could rule out this possibility, as PTGS1 inhibitors abolished mycolactone-induced hyperpolarization. Accordingly, we reasoned that the mediator responsible for the activation of TRAAK channels could correspond to one of the metabolites of arachidonic acid. With this respect, the anal-

ysis of our screen data identified only one relevant candidate, namely the enzyme prostaglandin E synthase 2 (PTGES2) (Figure 3F). Application of PGE₂, the synthesis of which is catalyzed by *ptges2*, induced a 4.1 ± 0.8-fold increase of the TRAAK current showing that release of potassium via TRAAK can be mediated by PGE₂ (Figure 3H). Altogether, these results are consistent with a model in which the mycolactone-induced pathway, via AT₂R at the input level, results in an increased activity of TRAAK potassium channels at the output level, with the intermediate pathway as detailed above.

Blockade of the AT₂R Signaling Cascade Results in Inhibition of Hypoesthesia Caused by Mycolactone

Completing the rationale for this molecular characterization, we further demonstrated its physiological relevance by investigating in vivo the causal role of AT₂R in hypoesthesia. We first verified that AT₂R is not expressed in neurons in our KO model (Hein et al., 1995) (Figure 4A). When mycolactone was injected into the footpads of AT₂R KO mice, the animals exhibited unaltered pain sensitivity in the tail-flick test, with an average response time of 8 s, which contrasted with a delayed response by an average of 12 s in wild-type animals (Figure 4B). Thus, AT₂R expression is critical for the occurrence of mycolactone-mediated hypoesthesia under physiological conditions. This result was substantiated by the tail-flick test on wild-type and AT₂R-KO mice that presented nonulcerative lesions after infection with *M. ulcerans* (Figure 4C). In addition, upon treating *M. ulcerans*-infected mice exhibiting edema with the selective AT₂R blocker PD123,319 or with piroxicam, an inhibitor of prostaglandin synthesis by PTGS1, we observed the same pain-sensitive phenotype as in the AT₂R-KO animals (Figures 4D and 4E). Taken together our results demonstrate the pivotal role of AT₂R signaling cascade in Buruli ulcer induced hypoesthesia.

DISCUSSION

The focus of the work here is the molecular dissection of a previously unanticipated infection strategy employed by a bacterium that uses the mycolactone toxin as an effective analgesic to annul the pain of the lesions it causes. It was previously believed that absence of pain in Buruli ulcer disease could be attributed to nerve damage, caused by the action of the toxin mycolactone secreted by *M. ulcerans*. Accordingly, we first revisited this hypothesis to test it in detail. We demonstrated, with purified as well as synthetic mycolactone, that the analgesic effect of the toxin was not accompanied by nerve degeneration. In addition, it is clear that *M. ulcerans* does not associate with

(C) Competitive binding of mycolactone to human AT₂R. Mean ± SD.

(D) Fluorescence ratio of neurons incubated with PD123,319, a selective inhibitor of AT₂R and loaded with bis-oxonol (DiSBAC₂(3)), before addition of mycolactone. Mean ± SEM.

(E) Fluorescence ratio of neurons incubated with Gα inhibitor pertussis toxin (PTX) and loaded with bis-oxonol (DiSBAC₂(3)) before addition of mycolactone. Mean ± SEM.

(F) Fluorescence ratios of Raw267.4 cells treated with various siRNAs or scrambled siRNA and loaded with bis-oxonol DiSBAC₂(3) before incubation with mycolactone. The ratios are normalized to that of the scrambled siRNA control. *Pla2g2f*, *Pla2g1br* and *Pla2g10* are members of three different groups of PLA₂-encoding genes. *Ptgs1*, COX-1; *Ptgs2*, prostaglandin E synthase 2; *Kcnk4*, potassium channel subfamily K member 4; *Kcnk13*, potassium channel subfamily K member 13. Mean ± SD.

(G) Fluorescence ratio of neurons incubated with FR122047, a selective inhibitor of Ptg1, before addition of mycolactone. Mean ± SEM.

(H) Current increase in inside-out patches containing TRAAK after application of 10 μM PGE₂.

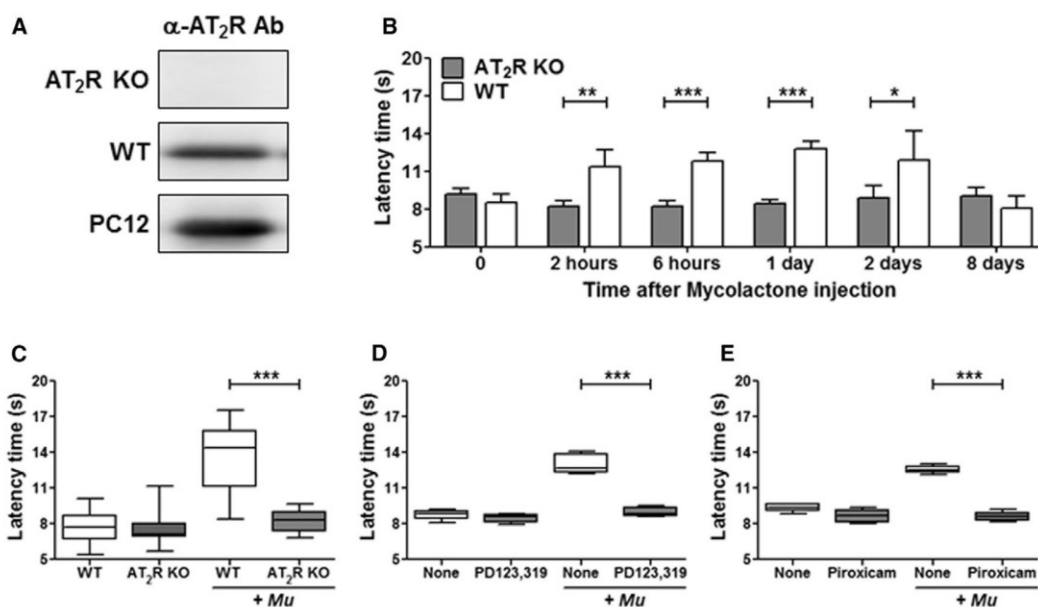


Figure 4. *M. ulcerans* and Mycolactone-Mediated Hypoesthesia Impaired In Vivo Upon Blockade of the AT₂R Signaling Cascade

(A) Detection of AT₂R by Western blot in neurons of wild-type (WT) or AT₂R-deficient mice (AT₂R KO). PC12 cells, strongly expressing AT₂R were used as a positive control.

(B) The nociceptive reflex was measured in AT₂R-KO (gray bars) or wild-type (white bars) mice, which had been inoculated with 5 μg of mycolactone. Mean ± SD, *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001, Student's t test.

(C) The nociceptive reflex was measured in AT₂R-KO (gray bars) or wild-type (white bars) mice, which had been inoculated with *M. ulcerans*. *M. ulcerans* : Mu, Whiskers plot, ***p<0.0001, Student's t test.

(D) The nociceptive reflex was measured in wild-type mice with *M. ulcerans*-induced nonulcerative lesions, subsequently treated with PD123,319 (white bars) or water vehicle (gray bars). Whiskers plot, ***p<0.0001, Student's t test.

(E) The nociceptive reflex was measured in wild-type mice with *M. ulcerans*-induced nonulcerative lesions, subsequently treated with piroxicam (white bars) or gelled water only (gray bars). Whiskers plot, ***p<0.0001, Student's t test. *M. ulcerans* (Mu).

nerve fibers, and it is most likely that the toxin reaches neurons through diffusion. Indeed, we have previously shown that the toxin mycolactone can be shuttled within vesicles in human lesions (Marsollier et al., 2007). In this background we endeavored to explore alternative mechanisms, other than nerve damage, accounting for the analgesic effect of mycolactone. Instead, we sought to investigate possible interference of the toxin with neural processes which could be involved in pain perception and we addressed the question of painlessness for early lesions that are not yet necrotic. It is likely that the effect of mycolactone on necrosis is relevant to yet another phenomenon (Guenin-Macé et al., 2013; Sarfo et al., 2013).

At a global level, we first demonstrated with electrophysiology that mycolactone, purified as well as synthetic, exerts a clear-cut effect on membrane potential, inducing hyperpolarization of neurons. Based on this result, we then deployed a coherent, multifaceted approach, to unravel the detailed molecular pathway underlying this effect. In this approach, we identified, at the input level, AT₂R receptor as the target of mycolactone. We further confirmed this result by showing that mycolactone-induced hyperpolarization is inhibited upon blocking AT₂R expression. Similarly, we showed that at the output level hyperpolarization was mediated by K⁺ channels, and we further refined this characterization showing the specific involvement

of TRAAK potassium channels. In order to gain a complete molecular picture of the effect of mycolactone, we further dissected the intermediate pathway between the input and output levels, showing that the intracellular pathway involved (1) activation of phospholipase A2, (2) release of arachidonic acid by COX-1 and (3) activation of TRAAK by PGE2. Finally, to firmly validate these findings on physiological grounds, we demonstrated the causal role in vivo of AT₂R in hypoesthesia.

In a global context, it will be interesting in future studies to consider in more detail several aspects of the pathway underlying the hypoesthesia model above. Thus, concerning the binding of mycolactone to AT₂R, the observed difference between affinities measured in vitro and quantifications in tissues (Figure S7) can seem at first surprising. However, very little is known about the stability and the metabolism of the toxin in vivo, with the possibility that metabolites derived from the toxin being active on AT₂R (Scherr et al., 2013). The investigation of such possibility can then be of potential pharmaceutical relevance. With this respect, it is also significant that a similar range of difference in concentrations between in vitro binding and cellular activity assays was previously reported for mycolactone in a completely different context (Guenin-Macé et al., 2013). Another intriguing aspect in our hypoesthesia model concerns the involvement of COX-1, whereas analgesic effect of NSAIDs was shown to be

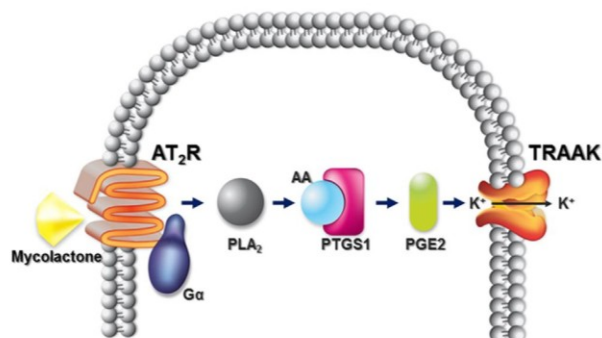


Figure 5. Model of the Signaling Cascade triggered by Mycolactone
Upon binding to the AT₂R receptor, coupled to G_{αi}, mycolactone triggers a signaling cascade leading to PLA₂ activation and inducing the synthesis of arachidonic acid. Arachidonic acid is then metabolized by COX-1 into PGE₂, leading to the opening of TRAAK channels. AA, arachidonic acid; PTGS1, COX-1; PGE₂, prostaglandin E₂; TRAAK, potassium channel subfamily K member 4.

associated with the inhibition of COX-1. Such observations clearly identify COX-1 as central, multifaceted, player in the control of pain. Of course it will be highly informative to determine whether such different mechanisms could be associated with different types of pain. Also COX-1 is known to mediate anti-inflammatory effect in immune cells, raising the question whether the AT₂R-mediated analgesic effect could also involve other immune cells. As a matter of fact, our demonstration here of the effect of mycolactone on macrophages, again via AT₂R, raises the possibility that the toxin acts as a multi-target weapon. Even though the scope of the study here concerned neuron targets for hypoesthesia, future studies concerning macrophages should identify the underlying effects (such as anti-inflammatory) in the case of such targets.

Beyond the molecular and physiological characterizations, the findings here can be cast in more general perspectives relevant to the theme of counteracting pain on health-oriented grounds. It is particularly significant to notice that the pathway dissected here involves a natural effector that does not belong to the different classes of analgesics of common use today, such as paracetamol (or acetaminophen), opiate molecules such as morphine, or nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) such as salicylates. Notably, because of series of, more or less severe, secondary effects it is rather unanimously recognized that new potent analgesics, showing less adverse effects, are highly desirable. With this respect the perspective in connecting the understanding of the implementation of analgesia in natural systems, such as the one described here, to the rational development of medical pain-killing products does not appear to be unrealistic. Emerging, but as yet disparate, results of genetic as well as pharmacological studies in humans and rodents point toward the critical involvement of various components of the pathway deciphered here in different steps of pain perception and alleviation. Thus, it is highly significant that recent studies aiming to identify rare genetic variants associated with pain sensation precisely pinpointed angiotensin pathways as being of critical importance in trait heritability for pain sensitivity

(Williams et al., 2012). On the other hand AT₂R receptors have been pinpointed recently, in completely independent contexts, as important potential targets for several synthetic analgesic drugs. Thus, AT₂R antagonist PD123,319 (also called EMA200) was reported to be effective in a rat model of prostate cancer-induced bone pain (Anand et al., 2013; Muralidharan et al., 2014). This is further corroborated by the fact that other EMA derivatives, EMA300 and EMA401, alleviate neuropathic pain through AT₂R (Rice et al., 2014; Smith et al., 2013).

It is then well possible that various such results may fit into a coherent yet multifaceted model, inspired by the one developed here (Figure 5), with the perspective of developing a rational basis for the design and selection of efficient analgesic molecules, directly inspired by natural ones. On more immediate grounds and in terms of health policies, unmasking the pathogenesis strategies of the *M. ulcerans* bacillus should contribute to a more knowledgeable attitude toward the disease and encourage patients to seek care in the early stages of infection.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Bacterium

M. ulcerans (strain no. 1615) was originally isolated from a skin biopsy of a human patient from Malaysia (George et al., 1999). The recombinant *M. ulcerans*-GFP bacterium (strain no. JKD8083) was derived from an Australian strain in which GFP expression is controlled by the *mls* SigA-like promoter (Tobias et al., 2009).

Mycolactones

Mycolactones were purified from *M. ulcerans* (strain 1615) extracts as previously described (George et al., 1999). Mycolactone purity was estimated to be better than 98%, based on HPLC profiles. Mycolactone was diluted to 4 mg/ml in absolute ethanol and stored in the dark in amber glass tubes. Synthesis of mycolactone was described elsewhere (Gersbach et al., 2011; Scherr et al., 2013). Synthetic mycolactone was diluted to 500 ng/ml.

Animal Experimentation

AT₂R knockout mice were generated and provided by L. Hein (Hein et al., 1995). Six-week-old female FV/BN wild-type (Charles River France, <http://www.criver.com/ico>) and AT₂R knockout (Hein et al., 1995) mice were maintained under conventional conditions in the animal house facility of the Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France (Agreement A 49 007 002), adhering to the institution's guidelines for animal husbandry.

Mouse Models

For inoculation with *M. ulcerans*, fifty microlitres of a suspension containing 5×10^4 bacteria were injected subcutaneously into the left footpads of mice. For inoculation with mycolactone, five micrograms of mycolactone diluted in 10 μ l of ethanol were injected subcutaneously into the left footpads of mice. In controls, 10 μ l of absolute ethanol alone were injected into the left footpads.

Pain Receptive Assay

The pain receptive assay was performed by adapting the tail-flick procedure, using the tail-flick unit (UGO BASILE). The sensitivity of the tissue to a noxious thermal stimulus was measured. The radiant heat stimulus was focused on the left footpad. The assay was performed twice each week on mice that had been previously anesthetized. This assay was validated by local application of Emla analgesic cream containing 5% lidocaine/prilocaine (Astra Zeneca).

Immunocytochemistry

After sacrifice, footpads were removed, frozen in isopentane cooled to -30°C , and stored at -80°C . Frozen tissues were serially sectioned using a Leica cryostat. Sections (12 μm) were fixed in cold methanol for 10 min and washed three times in PBS before blocking at room temperature for 1 hr in BSA 5%.

Sections were incubated overnight with Texas red-conjugated anti-B3 tubulin antibody (Sigma) diluted 1/200 in PBS with 5% BSA and then rinsed with PBS (3 × 5 min). The preparations were counterstained with 3 μM 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) for 5 min and washed twice with PBS. Slides were mounted with an antifading solution and observed with a confocal microscope (LSM, Leica). Tissues from seven mice per stage were analyzed, with 50 slides per mouse.

Mouse Sciatic Nerve Sections for Transmission Electron Microscopy

After deep anesthesia, a perfusion with phosphate buffer was performed after section of the femoral artery. Fixation of the tissue was then performed with a second perfusion with 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer fixation. The sciatic nerve was subsequently isolated by dissection. The samples were fixed for 30 min in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for 1 hr at 4°C and left to stand for 12 hr at 20°C in cacodylate buffer. Specimens were progressively dehydrated and embedded in Araldite (Fluka). After dehydration, thin sections were stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate and then examined on a JEOL 120 EX electron microscope.

Cell Culture

Macrophage cells (Raw264.7, ATCC TIB-71) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Invitrogen). Pheochromocytoma cell 12 (PC12) cells were plated on collagen IV-coated culture dishes in DMEM supplemented with 10% horse serum and 5% fetal bovine serum. After 6 days, differentiation to a neuronal phenotype was induced by incubation in DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% fetal bovine serum, and 100 ng/ml nerve growth factor (Invitrogen). The culture medium was changed every two days until differentiation was complete (6–7 days). Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from neonatal (P0 to P2) BALB/c and FVB/N mice according to an established protocol (Banker and Cowan, 1977) with minor modifications.

Electrophysiology

The membrane potential of PC-12 cells was recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in the current-clamp mode. PC-12 cells were grown for 7 days on glass coverslips before being harvested. After an overnight incubation, the glass coverslips were transferred into a recording chamber and continuously superfused with Ringer's saline buffer containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃, 12 mM glucose, buffered to pH 7.4, at 30–32°C and bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. Recording pipettes (3–5 MΩ resistance) were filled with 140 mM potassium gluconate, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 1.1 mM EGTA, 5 mM HEPES, 4 mM MgATP, 0.3 mM NaGTP and titrated to pH 7.2 with KOH. Membrane potential changes were monitored using an EPC10 quadro USB patch-clamp amplifier and PATCHMASTER software (HEKA Elektronik, Germany). Signals were sampled at 10 Hz, filtered at 3 kHz and analyzed with FITMASTER software (HEKA Elektronik). Cells were current-clamped close to their resting potential (–55 to –65 mV in average). Membrane potential was continuously monitored for 10–20 min before and 10–20 min after mycolactone application at 1.4 μg/ml using a pneumatic drug ejection system (PDES, npi electronic GmbH, Germany). Control cells were stimulated with 2% ethanol as vehicle. For IC₅₀ determinations for TRAAK, defolliculated *Xenopus* oocytes were injected with 50 nl of cRNA at 0.02–0.4 μg/μl encoding mTRAAK and recorded 2–4 days later. For electrophysiology, single oocytes were placed in a 0.3 ml perfusion chamber and impaled with two standard microelectrodes (1–2.5 MΩ resistance) filled with 3 M KCl and voltage clamped with a Dagan CA-1 amplifier, in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM HEPES [pH 7.4], with NaOH). Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Axon Instruments).

Cell-Based Fluorescence Assay, Image Acquisition by Automated Confocal Microscopy and Data Analysis

Raw264.7 macrophages were harvested with Versene (GIBCO) and seeded at a density of 10⁴ cells per well in 384-well plates (Evotec, Hamburg, Germany) in

50 μl RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (all from Invitrogen). After overnight incubation, the medium was removed, and the cells were labeled for 2 hr at 37°C with bis-(1,3-diethylthio-barbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC₂(3), Invitrogen, B413) at 62.5 μg/ml. The cells were then washed three times with imaging buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 2.9 mM sucrose. A first series of image acquisition was conducted to ascertain the proper labeling of the cells (T1int); mycolactone was then added to the cells. After 20 min incubation at room temperature under mild shaking (500 rpm), a second scan was performed to measure the intensity of the fluorescence of the cells (T2int). Confocal images were recorded on an automated fluorescent confocal microscope Opera (Evotec) using a 20× water objective (NA 0.70), 532 nm laser and 600 nm camera. Four fields per well were recorded. Each image was then processed using dedicated in-house image analysis software (IM). The image dynamics were checked through a series of statistical tests (assessing notably average intensities and standard deviations), designed to allow the removal of black or out-of-focus images. DiSBAC₂(3) staining was then segmented in the “DiSBAC stain” band using an in-house method (Fenistein et al., 2008), and the ratio of the surface intensity of the “DiSBAC stain” before and after mycolactone addition was determined for each well. This ratio is referred to as the Ratio [T2int/T1int].

Competitive Binding of Mycolactone to the Human AT₂R

[¹²⁵I]CGP 42,112A at 0.01 nM was used as agonist radioligand. Radioactivity was detected by scintillation counting (Cerep Inc, Seattle, WA, Assay Reference 0026). The radioligand was first incubated with membranes from human recombinant HEK293 cells and the bound radioactivity was measured. The membranes were then incubated with a high concentration of angiotensin II (1 μM) and with [¹²⁵I]CGP 42,112A radioactive ligand to determine nonspecific binding of the ligand to the AT₂R receptor. The radioligand and the mycolactone (eight different concentrations) were incubated with the cell membranes for 4 hr at 37°C to determine the IC₅₀ of the mycolactone.

Chemical Reagents

Tetraethylammonium (TEA), an inhibitor of various potassium channels and Piroxicam, a highly active inhibitor of prostaglandin were from Sigma. EMLA cream containing 5% lidocaine and prilocaine anesthetics was from Astra Zeneca. FR122047, a selective inhibitor of COX-1 signaling and PD123,319, a selective inhibitor of AT₂R signaling were from Tocris Bioscience. For the mouse study, 200 μl (daily renewed) solution of piroxicam at 0.5 mg/ml in 1% gelosed water was administered by gavage every day starting 30 days after *M. ulcerans* inoculation. Osmotic mini-pumps (AlzetVR model 2002, Palo Alto, CA) containing PD123,319 were implanted subcutaneously under anesthesia in the back of the neck of mice 30 days after *M. ulcerans* inoculation, with a delivery rate of 20 mg/kg/day in water.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Extended Experimental Procedures, seven figures, and two tables and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.040>.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

The author(s) have made the following declarations about their contributions. E.M., O.-R.S., T.C., L.M., and P.B. conceived and designed the experiments. E.M., O.-R.S., T.C., J.B., J.E., F.L., N.C., V.P., N.C.G., J.P.S.A., G.S., Y.C., L.P., L.M., and P.B. performed the experiments. T.C., D.F., T.P.S., Y.D., P.G., K.H.A., D.H., J.E., F.L., E.Y., L.M., and P.B. contributed reagents/materials/analysis tools. E.M., O.-R.S., T.C., J.E., F.L., D.H., V.P., N.C.G., Y.D., L.M., and P.B. performed data analysis. E.Y., L.M., and P.B. wrote the paper. Co-first authors E.M. conceived and performed in vivo experiments; O.-R.S. conceived and performed in vitro cellular experiments; and T.C. performed and analyzed the RNAi high-throughput high-content screening. All co-first and co-senior authors participated in the data analysis.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Natacha Denisenko, Viviane Cassisa, Camille Dantec, Rimi Oh, Jean-Philippe Carralot, Antoine Caillon, and Pierre Legras for their technical assistance; Gerd Pluschke and Nicole Scherr for generous gift of the synthetic mycolactone; Gaspard Deloison, Elizabeth Werkmeister, Antonino Bongiovanni, and Frank Lafont from the Bioluminescence Center of Lille for technical assistance; Guillaume Mabileau from the SCIAM platform for electron microscopy; François Trottein for advices on prostaglandins; and Olivier Neyrolles for his critical reading of the manuscript. Lutz Hein generated and generously offered the AT₂R KO mice for the experiments. Financial support for this work was provided by the Korea Research Foundation (Grant K20802001409-09B1300-03700), INSERM-Avenir, ANRS, Projet Transversal de Recherche de l'Institut Pasteur (PTR212), the STAR Project, the Raoul Follereau Foundation, the European Community (ERC-STG Grant n°260901, MM4TB Grant n°260872), the Agence Nationale de Recherche, the Feder (12001407 (D-AL) Equipex Imaginex BioMed), the Region Nord Pas de Calais (1200080), and the Region Pays de la Loire (ARMINA project).

Received: June 10, 2013

Revised: April 1, 2014

Accepted: April 24, 2014

Published: June 19, 2014

REFERENCES

- Anand, U., Facer, P., Yiangou, Y., Sinisi, M., Fox, M., McCarthy, T., Bountra, C., Korchev, Y.E., and Anand, P. (2013). Angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) localization and antagonist-mediated inhibition of capsaicin responses and neurite outgrowth in human and rat sensory neurons. *Eur. J. Pain* 17, 1012–1026.
- Asiedu, K., Sherpier, R., and Raviglione, M.C. (2000). Buruli Ulcer *Mycobacterium ulcerans* infection. W.H.O. Global Buruli Ulcer Initiative. Report 2000 World Health Organisation (Geneva: WHO).
- Banker, G.A., and Cowan, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res.* 126, 397–42.
- Bedecs, K., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A.D., and Nahmias, C. (1997). Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem. J.* 325, 449–454.
- Besson, J.M. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610–1615.
- Carralot, J.P., Kim, T.K., Lenseigne, B., Boese, A.S., Sommer, P., Genovesio, A., and Brodin, P. (2009). Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. *J. Biomol. Screen.* 14, 151–160.
- Clere, N., Corre, I., Faure, S., Guihot, A.L., Vessièrès, E., Chalopin, M., Morel, A., Coqueret, O., Hein, L., Delneste, Y., et al. (2010). Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int. J. Cancer* 127, 2279–2291.
- Coutanceau, E., Marsollier, L., Brosch, R., Perret, E., Goossens, P., Tanguy, M., Cole, S.T., Small, P.L., and Demangel, C. (2005). Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of *Mycobacterium ulcerans*: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell. Microbiol.* 7, 1187–1196.
- Dall'Asta, V., Gatti, R., Orlandini, G., Rossi, P.A., Rotoli, B.M., Sala, R., Bussoleti, O., and Gazzola, G.C. (1997). Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol-loaded cells. *Exp. Cell Res.* 231, 260–268.
- En, J., Goto, M., Nakanaga, K., Higashi, M., Ishii, N., Saito, H., Yonezawa, S., Hamada, H., and Small, P.L. (2008). Mycolactone is responsible for the painlessness of *Mycobacterium ulcerans* infection (buruli ulcer) in a murine study. *Infect. Immun.* 76, 2002–2007.
- Fenistein, D., Lenseigne, B., Christophe, T., Brodin, P., and Genovesio, A. (2008). A fast, fully automated cell segmentation algorithm for high-throughput and high-content screening. *Cytometry A* 73, 958–964.
- Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., and Norris, M.D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat. Rev. Cancer* 10, 147–156.
- George, K.M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., and Small, P.L. (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from *Mycobacterium ulcerans* required for virulence. *Science* 283, 854–857.
- Gersbach, P., Jantsch, A., Feyen, F., Scherr, N., Dangy, J.P., Pluschke, G., and Altmann, K.H. (2011). A ring-closing metathesis (RCM)-based approach to mycolactones A/B. *Chemistry* 17, 13017–13031.
- Goto, M., Nakanaga, K., Aung, T., Hamada, T., Yamada, N., Nomoto, M., Kitajima, S., Ishii, N., Yonezawa, S., and Saito, H. (2006). Nerve damage in *Mycobacterium ulcerans*-infected mice: probable cause of painlessness in buruli ulcer. *Am. J. Pathol.* 168, 805–811.
- Griffin, J.W., and Thompson, W.J. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56, 1518–1531.
- Guenin-Macé, L., Carrette, F., Asperti-Boursin, F., Le Bon, A., Caleechum, L., Di Bartolo, V., Fontanet, A., Bismuth, G., and Demangel, C. (2011). Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 12833–12838.
- Guenin-Macé, L., Veyron-Churlet, R., Thoulouze, M.I., Romet-Lemonne, G., Hong, H., Leadlay, P.F., Danckaert, A., Ruf, M.T., Mostowy, S., Zurzolo, C., et al. (2013). Mycolactone activation of Wiskott-Aldrich syndrome proteins underpins Buruli ulcer formation. *J. Clin. Invest.* 123, 1501–1512.
- Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J., and Kobilka, B.K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744–747.
- Hoeijmakers, J.G., Faber, C.G., Lauria, G., Merckies, I.S., and Waxman, S.G. (2012). Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nat Rev Neurol* 8, 369–379.
- Johnson, P.D., Stinear, T., Small, P.L., Pluschke, G., Merritt, R.W., Portaels, F., Huygen, K., Hayman, J.A., and Asiedu, K. (2005). Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med.* 2, e108.
- Kang, J., Posner, P., and Summers, C. (1994). Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am. J. Physiol.* 267, C1389–C1397.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J.* 19, 1784–1793.
- Marsollier, L., Aubry, J., Coutanceau, E., André, J.P., Small, P.L., Milon, G., Legras, P., Guadagnini, S., Carbonnelle, B., and Cole, S.T. (2005). Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell. Microbiol.* 7, 935–943.
- Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Korduláková, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., Aubry, J., Milon, G., Legras, P., André, J.P., et al. (2007). Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog.* 3, e62.
- Muralidharan, A., Wyse, B.D., and Smith, M.T. (2014). Analgesic efficacy and mode of action of a selective small molecule angiotensin II type 2 receptor antagonist in a rat model of prostate cancer-induced bone pain. *Pain Med.* 15, 93–110.
- Noël, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 5, 402–409.
- Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends Endocrinol. Metab.* 11, 1–6.
- Pelegri-da-Silva, A., Martins, A.R., and Prado, W.A. (2005). A new role for the renin-angiotensin system in the rat periaqueductal gray matter: angiotensin receptor-mediated modulation of nociception. *Neuroscience* 132, 453–463.
- Rice, A.S., Dworkin, R.H., McCarthy, T.D., Anand, P., Bountra, C., McCloud, P.I., Hill, J., Cutter, G., Kitson, G., Desem, N., and Raff, M.; EMA401-003 study group (2014). EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic

- neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *Lancet* 383, 1637–1647.
- Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., and Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling. *Neuron* 74, 1005–1014.
- Sarfo, F.S., Converse, P.J., Almeida, D.V., Zhang, J., Robinson, C., Wansbrough-Jones, M., and Grosset, J.H. (2013). Microbiological, histological, immunological, and toxin response to antibiotic treatment in the mouse model of *Mycobacterium ulcerans* disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2101.
- Scherr, N., Gersbach, P., Dangy, J.P., Bomio, C., Li, J., Altmann, K.H., and Pluschke, G. (2013). Structure-activity relationship studies on the macrolide exotoxin mycolactone of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2143.
- Simmonds, R.E., Lali, F.V., Smallic, T., Small, P.L., and Foxwell, B.M. (2009). Mycolactone inhibits monocyte cytokine production by a posttranscriptional mechanism. *J. Immunol.* 182, 2194–2202.
- Sizaire, V., Nackers, F., Comte, E., and Portaels, F. (2006). *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect. Dis.* 6, 288–296.
- Smith, M.T., Wyse, B.D., and Edwards, S.R. (2013). Small molecule angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) antagonists as novel analgesics for neuropathic pain: comparative pharmacokinetics, radioligand binding, and efficacy in rats. *Pain Med.* 14, 692–705.
- Sumners, C., and Gelband, C.H. (1998). Neuronal ion channel signalling pathways: modulation by angiotensin II. *Cell. Signal.* 10, 303–311.
- Szelenyi, I. (2013). Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflamm. Res.* 62, 251–258.
- Tobias, N.J., Seemann, T., Pidot, S.J., Porter, J.L., Marsollier, L., Marion, E., Letournel, F., Zakir, T., Azuolas, J., Wallace, J.R., et al. (2009). Mycolactone gene expression is controlled by strong SigA-like promoters with utility in studies of *Mycobacterium ulcerans* and buruli ulcer. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e553.
- Torrado, E., Fraga, A.G., Logarinho, E., Martins, T.G., Carmona, J.A., Gama, J.B., Carvalho, M.A., Proença, F., Castro, A.G., and Pedrosa, J. (2010). IFN- γ -dependent activation of macrophages during experimental infections by *Mycobacterium ulcerans* is impaired by the toxin mycolactone. *J. Immunol.* 184, 947–955.
- Wansbrough-Jones, M., and Phillips, R. (2006). Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 367, 1849–1858.
- Williams, F.M., Scollen, S., Cao, D., Memari, Y., Hyde, C.L., Zhang, B., Sidders, B., Ziemek, D., Shi, Y., Harris, J., et al. (2012). Genes contributing to pain sensitivity in the normal population: an exome sequencing study. *PLoS Genet.* 8, e1003095.

II.3.3 Conclusion

Lors de ce projet, nous avons décortiqué le mécanisme moléculaire de la stratégie d'infection de la bactérie *Mycobacterium ulcerans*. Elle produit une toxine: la mycolactone, qui induit une analgésie au niveau des lésions. Il avait précédemment été proposé que cette absence de douleur été due à la destruction des neurones sensoriels de la douleur. Or, cette hypothèse n'est pas compatible avec l'analgésie observée lors des stades précoces de l'infection où les lésions cellulaires ne sont pas encore présentes. De plus, il a été montré que *M. ulcerans* n'est pas associée aux nerfs, l'effet de la toxine étant dû à sa diffusion dans le neurone. Cette diffusion est possible *via* des vésicules de transport (Marsollier et al., 2007). Au vu de ce contexte, nous avons cherché à comprendre comment cette toxine induit son effet analgésique. Notre hypothèse étant que la mycolactone agit sur le processus neuronal impliqué dans la perception de la douleur.

Notre première observation fut que la mycolactone induit une hyperpolarisation des cellules. Celle-ci peut expliquer l'effet analgésique de la toxine puisque l'hyperpolarisation du neurone diminue sa sensibilité. Grâce à un crible à haut débit, nous avons pu caractériser les différents acteurs de cette régulation et proposer le modèle suivant.

La mycolactone se fixe sur le récepteur à l'angiotensine II de type 2 (AT2R) activant la phospholipase A2. Celle-ci produit de l'acide arachidonique qui va être métabolisé en PGE₂. Ce phospholipide va activer le canal TRAAK et induire l'hyperpolarisation de la cellule. Ce modèle a été confirmé *in vitro* grâce à des expériences de pharmacologie mais également *in vivo* grâce entre autre à des souris KO pour AT2R.

C'est la première fois que ce type de régulation est caractérisé pour le canal TRAAK. TRAAK n'était jusqu'alors connu que pour des rôles de senseur permettant de répondre à un *stimulus* ou à un changement d'environnement. Ici, TRAAK est à la sortie d'une voie de signalisation: ce qui est un rôle original pour ce canal.

Enfin, ce modèle est un mécanisme nouveau du contrôle de la sensibilité d'un neurone par une toxine. En effet la molécule ne vient pas directement interagir avec le canal mais passe par une voie de signalisation. Cela est intéressant pour le développement de nouveaux traitements analgésiques, car tous les acteurs de la voie de signalisation peuvent être ciblés pour produire de nouveaux analgésiques.

Ce projet a permis d'écrire un brevet qui concerne un procédé de traitement de la douleur chez les personnes. Celui-ci comprend l'administration d'au moins un agoniste des récepteurs type 2 de l'angiotensine II (des AT2R) stimulant la voie impliquant les canaux K⁺ stimulés par acide arachidonique liés à TWIK1 (TRAAK) (Annexe 2).

C'est pour cela que nous avons décidé de continuer à travailler dessus. La suite de ce projet s'est focalisée sur la caractérisation de la voie de signalisation induite par la mycolactone en présence d'AT2R. Le matériel et méthode de cette partie peut être trouvé en Annexe 1.

II.3.4 La régulation de TRAAK par AT2R: Une voie de signalisation non conventionnelle

Le mécanisme d'action de la mycolactone sur le canal TRAAK pourrait être un bon point de départ pour le développement de nouveaux analgésiques. Tout d'abord, l'absence de douleur lors de l'ulcère de Buruli est constante. Les premiers symptômes douloureux n'apparaissent que lors des stades les plus avancés avec des lésions très importantes ou lors du traitement. Cela laisse penser qu'il n'y a pas de désensibilisation de la voie. Donc, en théorie un traitement développé à partir de cette toxine aura peu d'effet d'accoutumance, évitant ainsi l'augmentation des doses administrés. Une autre caractéristique intéressante de la mycolactone est sa spécificité. En effet, il faut la présence du récepteur AT2R et du canal TRAAK pour avoir un effet, laissant penser qu'un médicament basé sur ce principe aura peu d'effets secondaires.

Le dernier projet de thèse a consisté à étudier plus précisément l'action de la mycolactone sur le canal TRAAK *via* le récepteur AT2R. Pour cela, j'ai utilisé un système d'expression hétérologue, les cellules HEK. Ces cellules expriment de faibles courants endogènes et nous ont permis dans un premier temps de déterminer les effets de la mycolactone sur le canal TRAAK en présence ou non du récepteur AT2R. Une fois le modèle validé, nous avons testé plusieurs molécules pour déterminer le mode d'action de la mycolactone. Enfin, j'ai caractérisé plus en détail la voie de signalisation impliquée par la toxine ainsi que les différents domaines des protéines impliqués.

II.3.4.1 AT2R

Le récepteur à l'angiotensine II de type 2 fait partie du système rénine/angiotensine. Il fut caractérisé à la fin des années 80 (Chiu et al., 1989) et cloné quelques années plus tard (Kambayashi et al., 1993). C'est une protéine de 363 acides aminés (41kDa) qui fait partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G. Malgré le fait qu'il ait la même affinité pour l'angiotensine que le récepteur à l'angiotensine II de type I (AT1R), il ne possède que 32% d'homologie avec ce dernier (Kambayashi et al., 1993). Il est exprimé de manière ubiquitaire dans le fœtus puis son expression diminue avec la naissance. Chez l'adulte, il est exprimé dans le cœur, le rein, le système nerveux central et périphérique (Matavelli and Siragy, 2015).

La contribution physiologique et physiopathologique de ce récepteur n'est pas complètement élucidée. Les connaissances actuelles suggèrent que dans des conditions physiologiques normales, le récepteur AT2R contrebalance les effets du récepteur AT1R. En effet, l'activation du récepteur AT2R contrecarre les effets du récepteur AT1R en inhibant la prolifération et la différenciation cellulaire, la vasodilatation et en réduisant l'inflammation ainsi que le stress-oxydatif (Matavelli and Siragy, 2015).

Ce récepteur aurait aussi un rôle dans les neurones des DRG et plus particulièrement dans leur hyperexcitabilité (Anand et al., 2013) ainsi que la croissance des neurites (Laflamme et al., 1996).

Malgré le fait qu'il soit associé à la famille des récepteurs couplés aux protéines G la voie de signalisation d'AT2R reste peu connue. L'expression de ce récepteur dans des cellules ne possédant pas AT1R ne montre aucune modification du calcium cytosolique ou de l'AMPC qui sont des indicateurs des protéines Gαq. De même, il y a pas de modification de l'activité de la phospholipase C indiquant une activation des protéines Gαs et Gαi (Gasparo et al., 2000). On peut tout de même noter que le récepteur interagit avec les protéines Gαi mais cela d'une manière différente des autres récepteurs (Zhang and Pratt, 1996).

II.3.4.2 Résultats

II.3.4.2.1 Effet de la mycolactone sur la régulation de TRAAK via AT2R.

Dans un premier temps j'ai testé dans des HEK TSA 295 si la mycolactone pouvait activer le canal TRAAK en présence ou absence du récepteur AT2R. Les cellules exprimant, soit le canal seul, soit le canal et le récepteur, ont été incubées avec 10μM de mycolactone. Les courants ont ensuite été enregistrés grâce à la technique du patch clamp en configuration cellule entière.

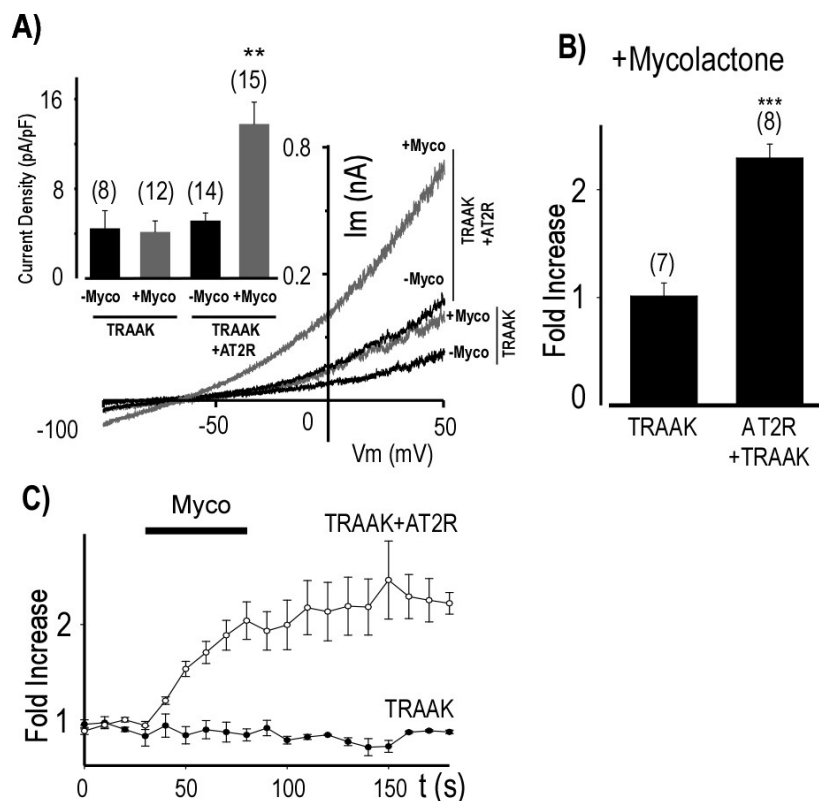


Figure 43: Effet de la mycolactone (Myco) sur le canal TRAAK en présence d'AT2R. (A) Effet de la mycolactone (10μM) sur le courant TRAAK dans des cellules exprimant soit TRAAK seul, soit AT2R et TRAAK. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test Mann-Whitney montre de manière significative (** $p < 0.01$) s'il y a une différence entre les conditions AT2R+TRAAK et AT2R+TRAAK+Myco. (B) Histogramme représentant l'augmentation de la densité de courant TRAAK à 0mV induit par la mycolactone en présence d'AT2R. Un test t de student montre qu'il y a une différence significative (** $p < 0,001$) entre la condition TRAAK et AT2R+TRAAK (C) Facteur d'augmentation du courant TRAAK en fonction du temps. La barre noire représente l'application en perfusion de 10μM de mycolactone. Les ronds blancs représentent la condition AT2R/TRAAK, les ronds noirs représentent la condition TRAAK seul. Pour tous les histogrammes, les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrés.

Comme le montre la Figure 43 A, dans les cellules HEK, la mycolactone n'a pas d'effet sur le canal TRAAK (densité de courant à 0mV avant application $4,47 \pm 1,57$ pA/pF et après application de mycolactone $4,15 \pm 0,98$ pA/pF). Par contre, en présence du récepteur AT2R, la densité de courant moyenne s'élève de $5,16 \pm 0,67$ pA/pF à $13,78 \pm 1,95$ pA/pF lorsque que la mycolactone est appliquée. Le facteur d'augmentation (Figure 43 B) induit par la toxine en perfusion sur le canal TRAAK en présence d'AT2R est de $2,92 \pm 0,13$. Ces premiers résultats indiquent que la mycolactone peut activer le canal TRAAK dans des cellules HEK en présence du récepteur AT2R. La Figure 43 C nous montre la cinétique d'activation du canal en présence de la mycolactone. On observe que le facteur d'augmentation maximal est atteint en environ 1 minute. Lors de l'ulcère de Buruli, l'analgésie est pérenne dans le temps, celle-ci étant constante durant toute la maladie. Nous avons émis l'hypothèse que l'effet de la mycolactone est constant dans le temps.

J'ai testé alors l'effet de la toxine sur une incubation longue ainsi que sa réversibilité. Pour cela, j'ai enregistré les courants des cellules après 1h d'incubation (Figure 44) puis 1h30 après avoir enlevé la mycolactone du milieu extracellulaire.

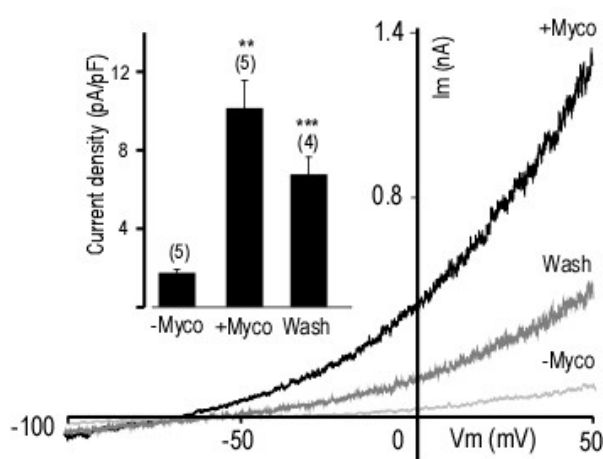


Figure 44: Réversibilité de l'action de la mycolactone. L'action de la mycolactone est pérenne dans le temps. Effet de la mycolactone ($10\mu\text{M}$) sur le courant TRAAK en présence d'AT2R 1 heure après incubation (noir) puis 1h30 après le rinçage (gris foncé). Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms . L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV . Un test t de student montre qu'il y a une différence significative (***) $p < 0,001$, ** $p < 0,01$) entre la condition sans mycolactone et les deux autres. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrés.

On observe (Figure 44) qu'après incubation les densités de courants ($10,12 \pm 1,42$ pA/pF) sont toujours significativement ($p < 0,01$) plus importantes que la condition sans mycolactone ($1,76 \pm 0,18$ pA/pF). On peut observer que l'amplitude du courant suite au rinçage ($6,78 \pm 0,88$ pA/pF) reste significativement ($p < 0,001$) plus importante que les cellules contrôlent ($1,76 \pm 0,18$ pA/pF).

Ces premiers résultats nous montrent que l'on retrouve les effets de la mycolactone sur le canal TRAAK *via* AT2R dans un système d'expression hétérologue. De plus, il semble qu'il n'y

a pas de désensibilisation et que la réversion de l'effet soit lente. Cela valide ce modèle d'expression hétérologue, nous l'utiliserons pour la suite du projet.

II.3.4.2.2 Etude pharmacologique de la régulation de TRAAK par AT2R.

Nous avons ensuite voulu savoir si cette voie de signalisation pouvait être induite et modulée par les différents ligands connus pour le récepteur AT2R. Dans un premier temps, nous avons testé l'angiotensine II le ligand naturel d'AT2R.

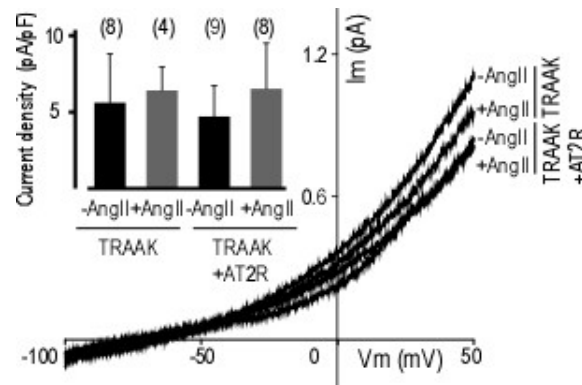


Figure 45: L'angiotensine II n'a pas d'effet sur TRAAK en présence ou absence d'AT2R. Effet de l'angiotensine II (1µM) sur le canal TRAAK en présence ou non d'AT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrés.

Comme nous pouvons l'observer dans la Figure 45 l'angiotensine II (1µM) n'est pas capable de modifier le courant TRAAK en présence ou absence d'AT2R. Les densités de courants avant (condition TRAAK: $5,62 \pm 1,12$ pA/pF; condition TRAAK+AT2R: $4,72 \pm 0,67$ pA/pF) et après application de l'angiotensine II (condition TRAAK: $6,42 \pm 0,76$ pA/pF; condition TRAAK+AT2R: $6,52 \pm 1,04$ pA/pF) ne sont pas significativement différentes (condition TRAAK: $p > 0,6$; condition TRAAK+AT2R: $p > 0,1$). Cela laisse supposer que l'AngII et la mycolactone n'induisent pas la même voie de signalisation. Malgré cela ils peuvent tout de même avoir en commun le site de fixation. Nous avons testé si l'angiotensine II pouvait entrer en compétition avec la mycolactone en enregistrant les effets de la toxine sur TRAAK et AT2R en présence d'AngII.

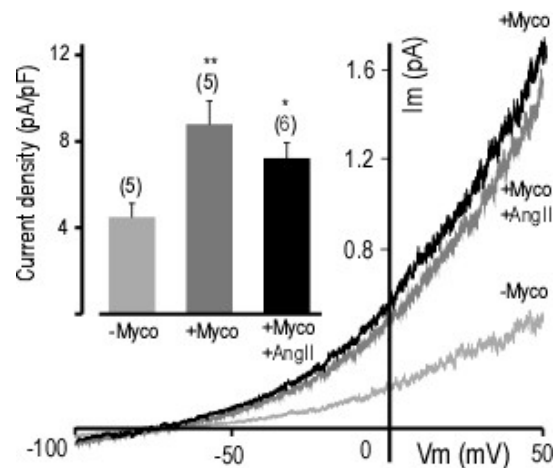


Figure 46: L'angiotensine II n'est pas capable de reverser les effets de la mycolactone. Effet de l'angiotensine II (1 μ M) sur le courant TRAAK en présence de la mycolactone (10 μ M) et d'AT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test t de student montre qu'il y a une différence significative (** $p < 0,01$, * $p < 0,05$) entre la condition sans mycolactone et les deux autres. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Nous pouvons observer Figure 46 que l'AngII n'influence pas le courant induit par la mycolactone (-**Myco**: $4,49 \pm 0,63$ pA/pF; **+Myco**: $8,80 \pm 1,09$ pA/pF; **+Myco+AngII**: $7,22 \pm 0,72$ pA/pF). Ainsi, soit les deux molécules ont un site de fixation différent soit la mycolactone est beaucoup plus affine pour AT2R que l'AngII.

Pour confirmer ce résultat, j'ai testé l'effet du C21 sur TRAAK en présence ou non d'AT2R. Le C21 est le premier activateur non peptidique développé pour AT2R (Wan et al., 2004) et est couramment utilisé pour étudier le récepteur (Steckelings et al., 2010; Verdonk et al., 2012). J'ai incubé les cellules exprimant TRAAK seul ou TRAAK+AT2R avec 10 μ M de C21 en présence ou non de mycolactone.

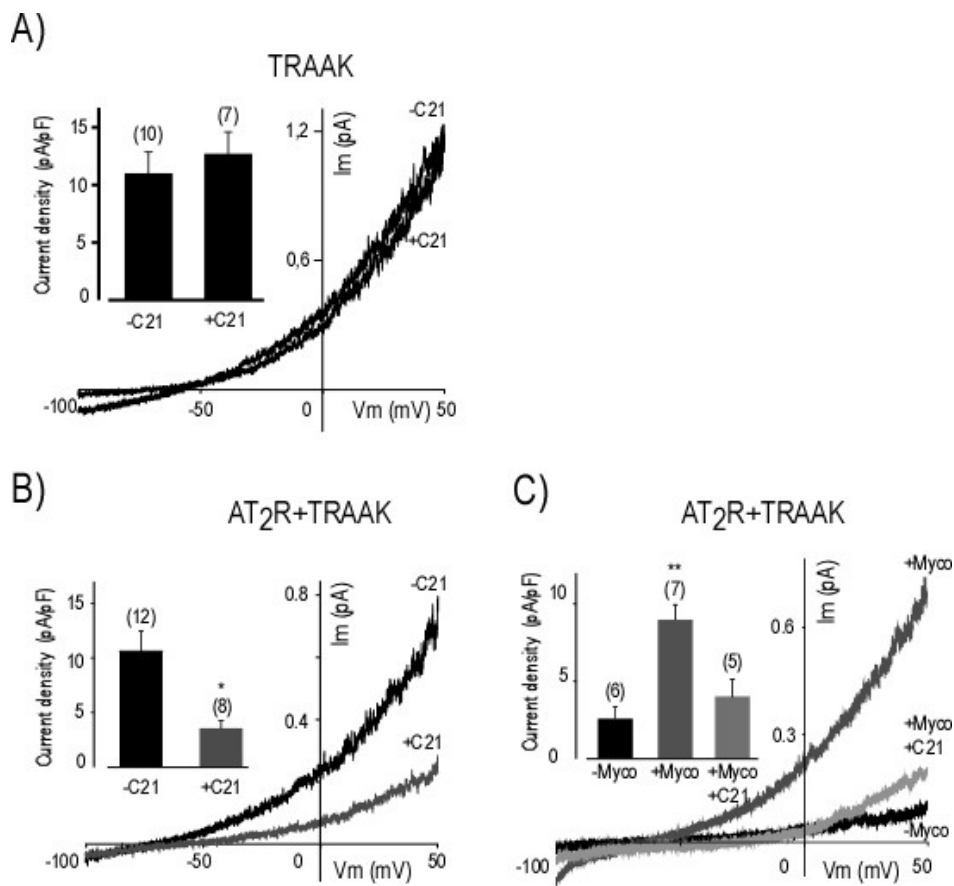


Figure 47: Le C21 inhibe le courant TRAAK en présence d'AT₂R et ou de mycolactone. (A) Effet du C21 sur le courant TRAAK. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. (B) Effet du C21 sur les courant TRAAK en présence d'AT₂R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test t de student montre qu'il y a une différence significative (* $p < 0,05$) entre les deux conditions. (C) Effet du C21 sur les courants TRAAK en présence d'AT₂R et de mycolactone. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test ANOVA suivi d'un test post Hoc de Tuckey montre qu'il y a une différence significative (** $p < 0,01$) entre la condition avec mycolactone et les deux autres. Pour tous les histogrammes les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Tout d'abord le C21 n'a pas d'effet sur le courant TRAAK (Figure 47 A). En effet, il n'y pas de différence significative ($p > 0,5$) entre la condition TRAAK ($11,03 \pm 1,83$ pA/pF) et la condition incubée avec le composé ($12,71 \pm 1,88$ pA/pF).

De manière étonnante, on observe que l'incubation de $10 \mu\text{M}$ de C21 diminue le courant TRAAK en présence d'AT₂R (Figure 47 B). Les moyennes de densité de courant à 0mV sont significativement différentes ($P < 0,01$) entre la condition contrôle ($9,82 \pm 1,56$ pA/pF) et les cellules incubées avec le composé ($3,12 \pm 0,63$ pA/pF). Peut-il entrer en compétition avec la mycolactone ? On peut observer (Figure 47 C) que le C21 peut reverser les effets de la mycolactone. La densité de courant de cellules incubées avec la toxine et le C21 ($4,03 \pm 1,15$ pA/pF) n'est pas significativement différente ($p > 0,2$) de la condition contrôle ($2,60 \pm 0,73$ pA/pF), toutes les deux étant inférieures ($p < 0,01$) aux courants des cellules seulement incubées avec la mycolactone ($8,98 \pm 0,971$ pA/pF). Un agoniste d'AT₂R induit donc

l'inhibition du canal TRAAK et réverse les effets de la mycolactone, il peut y avoir plusieurs explications à cela. Les voies de signalisation en aval d'AT2R sont nombreuses et atypiques pour un GPCR (Namsolleck et al., 2014), le C21 pourrait induire une voie de signalisation qui interfère avec celle de la mycolactone induisant ainsi la réversion de ces effets sur TRAAK.

Etant donné que les activateurs d'AT2R se comportent de manières inhabituelles sur TRAAK nous avons testé l'effet d'un inhibiteur du récepteur, l'EMA401 à 10 μ M. Il est intéressant de noter que cet inhibiteur est utilisé dans le traitement des douleurs neuropathiques (McCarthy, 2014; Rice et al., 2014).

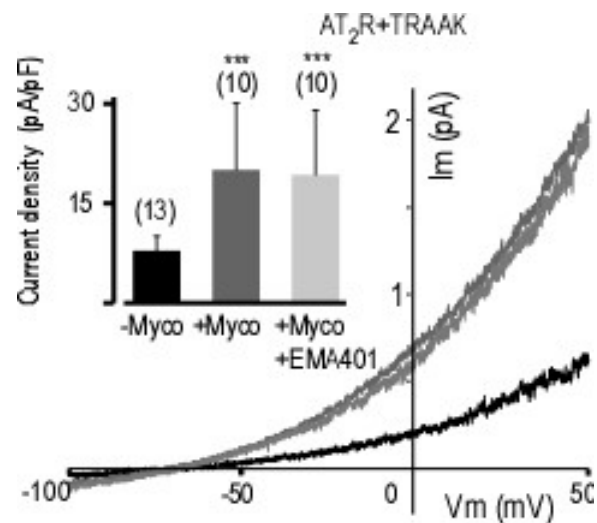


Figure 48: L'EMA401 n'est pas capable de reverser les effets de la mycolactone. Effet de l'EMA401 (10 μ M) sur le courant TRAAK en présence de la mycolactone (10 μ M) et d'AT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test Mann-Whitney montre qu'il y a une différence significative (***) $p < 0,001$ entre la condition sans mycolactone et les deux autres. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

On peut observer (Figure 48) qu'en présence de Mycolactone cette molécule n'a pas d'effet sur le courant TRAAK. Les courants des conditions AT2R+TRAAK+Mycolactone (20,05 \pm 3,19 pA/pF) n'étant pas significativement différents ($p > 0,9$) des courants de la condition AT2R+TRAAK+Mycolactone+EMA401 (19,31 \pm 3,08 pA/pF), les courants de ces deux conditions étant significativement plus importants ($p < 0,001$) que la condition contrôle (7,89 \pm 0,60 pA/pF).

Pour conclure, les ligands classiques du récepteurs AT2R soit n'ont pas d'effet sur TRAAK (Angiotensine II, EMA401), soit ont un effet non attendu (C21). Cela laisse sous-entendre que les voies de signalisation classiques/connues d'AT2R ne sont pas mises en jeu par la mycolactone.

II.3.4.2.3 Spécificité d'action

Nous avons testé le récepteur AT1R qui bien qu'il lie l'angiotensine II possède une régulation ainsi qu'un rôle physiologique différent d'AT2R (Matavelli and Siragy, 2015).

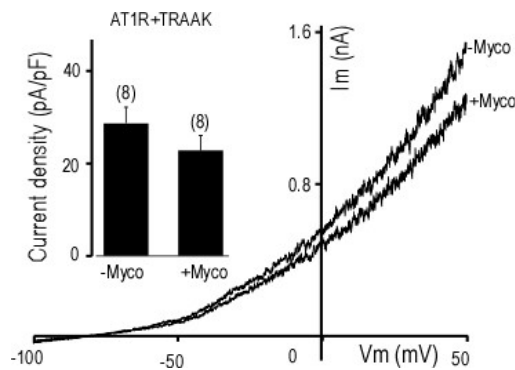


Figure 49: La mycolactone n'est pas capable de potentialiser le courant TRAAK en présence d'AT1R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Nous pouvons observer que la mycolactone n'est pas capable d'activer TRAAK en présence d'AT1R (Figure 49). En effet, la moyenne de densité de courant de la condition sans mycolactone est de $18,66 \pm 3,36$ pA/pF, ce qui n'est pas significativement différent ($p > 0,2$) de la densité de courant de la condition avec mycolactone soit $22,84 \pm 3,18$ pA/pF. Cette toxine semble donc être spécifique au couple AT2R/TRAAK.

II.3.4.2.4 Caractérisation de la voie de signalisation induite par la Mycolactone

Nous venons de voir que la mycolactone agit spécifiquement sur le couple AT2R/TRAAK via une voie de signalisation qui semble non canonique.

II.3.4.2.4.1 Pas d'implication des protéines G.

Le récepteur AT2R est connu pour être associé aux protéines G_i cependant TRAAK n'est pas un canal connu pour être sensible aux protéines G que cela soit de manière directe ou indirecte. De plus, nous avons vu que la mycolactone ne semble pas activer la voie de signalisation canonique du récepteur AT2R. J'ai donc testé si les protéines G étaient impliquées dans cette voie de signalisation. AT2R étant décrit comme un récepteur couplé G_i , j'ai utilisé un bloqueur des protéines G_i , la toxine pertussique (PTX), en présence ou absence de mycolactone.

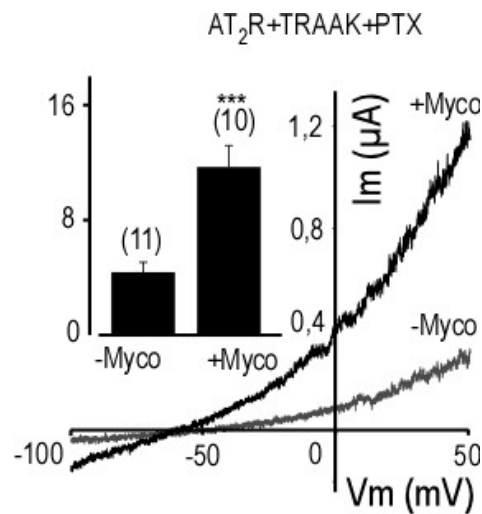


Figure 50: L'effet de la mycolactone sur TRAAK en présence d'AT₂R est indépendante des protéines G α i. Effet de la mycolactone (10 μM) sur TRAAK en présence d'AT₂R et de toxine pertussique (0,5 $\mu g/ml$). Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test Mann-Whitney qu'il y a une différence significative (***) $p < 0,001$ entre la condition avec et sans mycolactone. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Nous observons (Figure 50) que malgré la présence de PTX la densité de courant des cellules traitées par la mycolactone ($11,70 \pm 1,49$ pA/pF) reste significativement plus grand ($p < 0,001$) que dans les cellules contrôles ($4,38 \pm 0,68$ pA/pF). Cela montre que la voie est indépendante de l'activation des protéines Gi. Ce résultat a été confirmé grâce à une collaboration avec la plateforme ARPEGE (IGF Montpellier).

Nous avons ensuite testé fonctionnellement l'activation des protéines G. Pour cela, nous avons étudié un canal proche de TRAAK, TREK-1. Celui-ci fait partie de la même sous-famille que TRAAK mais il peut être modulé par l'activation des protéines Gi, Gs et Gq.

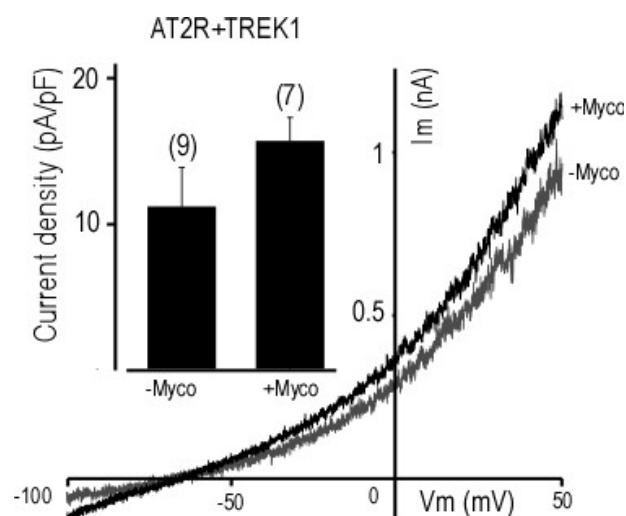


Figure 51: TREK-1 n'est pas modulé par la mycolactone en présence d'AT₂R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Nous pouvons observer que la mycolactone n'a aucun effet sur TREK-1 en présence du récepteur AT2R (Figure 51). Les densités de courants n'étant pas différentes ($p > 0,2$) entre la condition TREK-1+AT2R ($11,34 \pm 2,72$ pA/pF) et la condition TREK-1+AT2R+Myco ($15,89 \pm 1,63$ pA/pF). Ce résultat montre que la voie induite par la mycolactone n'implique pas les protéines Gi, Gs ou Gq au niveau fonctionnel.

Ce résultat est confirmé au niveau moléculaire puisque, *via* l'utilisation de la technique de BRET, par la plateforme ARPEGE, on a pu observer l'absence d'activation des protéines Gi, Go en présence de mycolactone.

II.3.4.2.4.2 Restriction spatiale

La mycolactone n'induit pas de dissociation des protéines G et est spécifique du couple AT2R/TRAAK, nous avons posé l'hypothèse que la régulation de TRAAK par la mycolactone *via* le récepteur AT2R est restreinte spatialement. Pour tester cela, j'ai enregistré les courants de cellules exprimant AT2R et TRAAK en configuration cellule attachée. Cette configuration permet d'enregistrer seulement les courants générés par les canaux présents au niveau de la pipette. En effet, lors du *patch*, on isole la partie de la membrane sous la pipette du milieu du milieu extracellulaire. Ainsi, les deux milieux ne peuvent pas se mélanger (Soejima and Noma, 1984) (Figure 52 A et B).

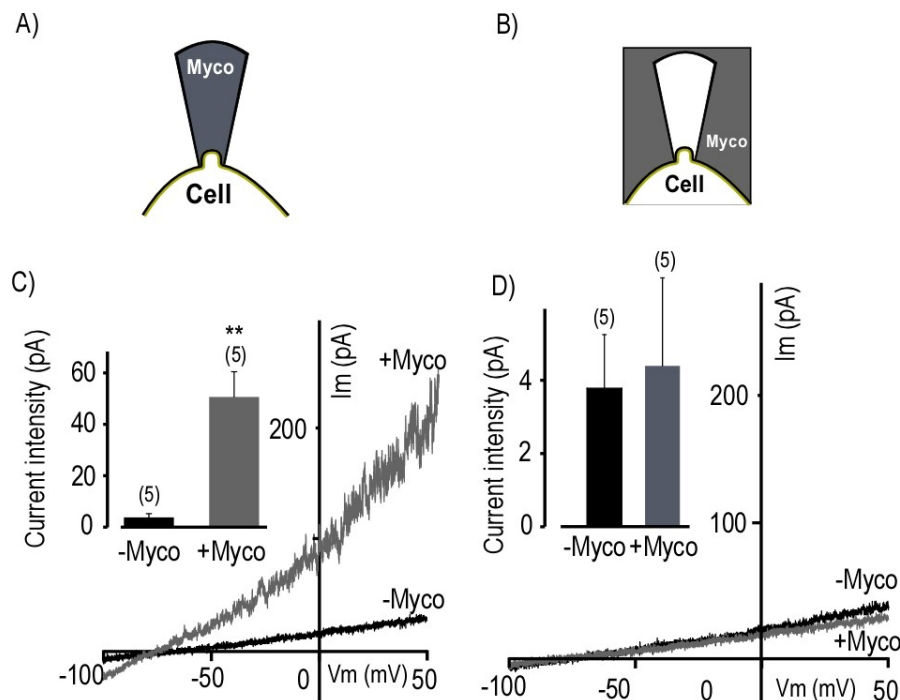


Figure 52: La voie de signalisation induite par la mycolactone est restreinte spatialement (A)(B) Schémas représentatifs des configurations de patch ainsi que la localisation de la mycolactone. (C) Effet de la mycolactone intrapipette en configuration cellule attachée. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courants obtenues à 0mV. Un test t de student montre qu'il y a une différence significative (** $p < 0,01$) entre la condition avec et sans mycolactone. (D) Effet de la mycolactone extracellulaire sur le courant TRAAK en configuration cellule attachée. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV.

Pour tous les histogrammes, les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Lorsque la mycolactone est présente dans la pipette, on observe (Figure 52 C) une augmentation du courant. L'intensité du courant est significativement plus importante ($p < 0,01$) dans la condition avec la mycolactone ($50,66 \pm 9,83$ pA) que dans la condition contrôle ($3,78 \pm 1,46$ pA). Lorsque la mycolactone est au niveau extracellulaire, on n'observe pas de différence significative ($p > 0,8$) entre la condition contrôle ($3,78 \pm 1,46$ pA) et la présence de toxine ($4,39 \pm 2,40$ pA). Lors de l'application du mycolactone dans le milieu extracellulaire les récepteurs sous la pipette ne peuvent pas être activés par la toxine (Figure 52 D). En l'absence de changement de courant, cela signifie que les canaux enregistrés ne sont pas activés donc que la voie de signalisation induite n'est pas répartie dans toute la cellule. Ces résultats nous montrent que la voie de signalisation induite par la mycolactone est restreinte spatialement et que l'ensemble des participants de la voie doivent être contenus dans un même microdomaine.

II.3.4.2.4.3 Co-immunoprécipitation

Les résultats obtenus précédemment nous permettent de poser l'hypothèse qu'AT2R et TRAAK sont dans un même microdomaine. Grâce à la collaboration de l'équipe de Priscille Brodin à l'institut Pasteur de Lille, la co-immunoprécipitation entre le canal étiqueté HA et le récepteur a pu être réalisé. Pour cela, des cellules HEK surexprimant de manière constitutive le récepteur AT2R étiqueté SNAP ont été transfectées avec le canal TRAAK étiqueté HA.

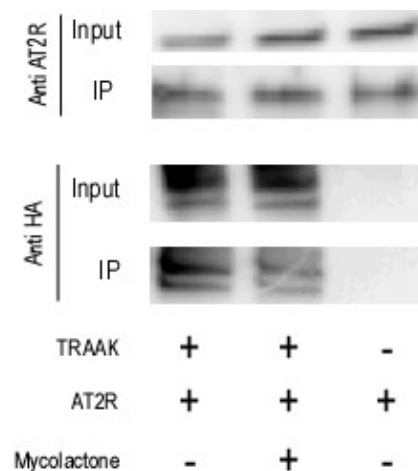


Figure 53: Le canal TRAAK co-immunoprécipite avec le récepteur AT2R-SNAP. Immunoprécipitation effectuée à partir d'un lysat de cellules HEK TSA exprimant de manière constitutive AT2R-SNAP et transfectées avec le canal TRAAK étiqueté HA. Les complexes canal/protéines associées sont précipités avec des billes SNAP-MagBead, puis la présence de TRAAK-HA ou AT2R est révélée par l'ajout d'un anticorps primaire anti-HA ou anti-AT2R suivi de celui d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase.

Les lysats cellulaires ont été précipités avec des billes SNAP-MagBead qui lient les protéines étiquetées SNAP. Les expériences de précipitation montrent que le canal TRAAK peut être immunoprécipité avec le récepteur AT2R étiqueté SNAP (Figure 53). Ce résultat indique qu'il y a une interaction entre les deux protéines, celle-ci pouvant être directe ou non et que ces deux protéines sont incluses dans un même microdomaine.

II.3.4.2.4.4 Domaines de régulations impliqués

Pour finir nous avons testé les domaines impliqués dans cette régulation. Tout d'abord avec TRAAK, nous savons qu'une grande partie des régulations des K_{2P} se fait *via* le domaine C-terminal du canal. Cela est particulièrement vrai pour les régulations dues à des partenaires protéiques (Comoglio et al., 2014; Sandoz et al., 2006, 2008). Nous avons posé l'hypothèse que c'est la partie C-terminal du canal TRAAK qui est impliqué ici. Pour tester cela, nous avons inversé le domaine C-terminal d'un canal qui n'est pas sensible au mycolactone (TREK-1) et de TRAAK. Nous avons ainsi utilisé les chimères suivantes: TREK-1CtTRAAK et TRAAKcTTRAAK (Figure 54 A). Nous avons ensuite testé leur capacité à répondre au mycolactone en présence du récepteur AT2R.

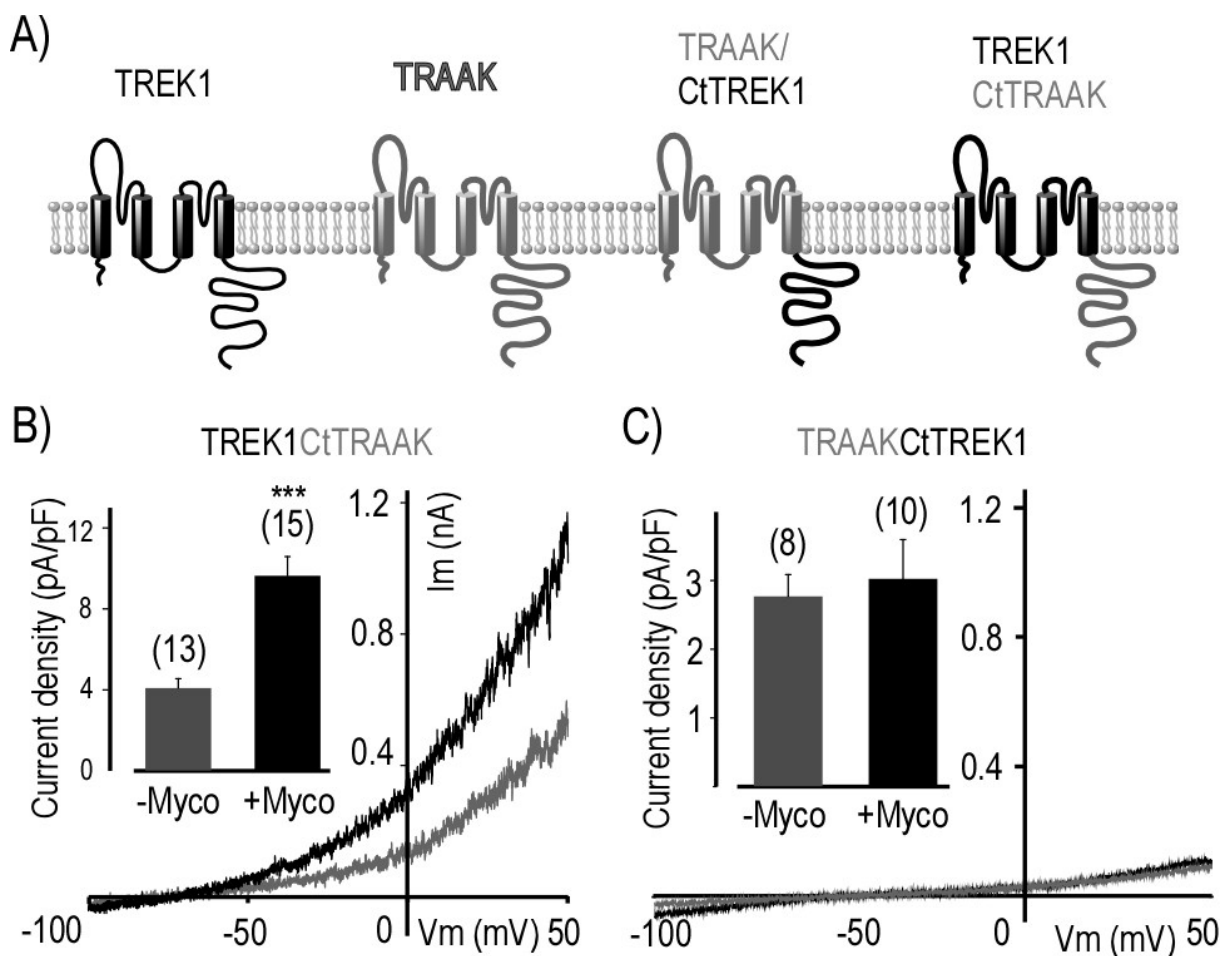


Figure 54: Le domaine C-terminal de TRAAK est impliqué dans la régulation du canal par la mycolactone via AT2R. (A) Schéma de la stratégie de synthèse des protéines chimériques TRAAK/CtTREK-1 et TREK-1/CtTRAAK. (B) Effet de la mycolactone sur la chimère TREK-1/CtTRAAK en présence d'AT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test Mann-Whitney qu'il y a une différence significative (***) $p < 0,001$ entre la condition avec et sans mycolactone. (C) Effet de la mycolactone sur la chimère TRAAK/CtTREK-1 en présence d'AT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Pour tous les histogrammes, les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

On peut observer (Figure 54 B) que le canal TREK-1CtTRAAK est activé par la mycolactone (contrôle $4,01 \pm 0,46$ pA/pF et TREK-1CtTRAAK+mycolactone: $9,73 \pm 0,91$ pA/pF). TRAAKcTTRAK-1 quand à lui n'est plus sensible à la mycolactone (Figure 54 C). Ces résultats indiquent que le domaine C-terminal de TRAAK est impliqué dans le mécanisme d'action de la mycolactone, le transférer de ce domaine permettant de transférer la sensibilité à la toxine.

Enfin, nous avons recherché le domaine du récepteur impliqué. Comme pour TRAAK c'est le domaine C-terminal qui a attiré notre attention. Chez les récepteurs couplés aux protéines G une grande partie des interactions se font au niveau du domaine C-terminal. Nous avons appliqué la même stratégie que pour le canal en échangeant le domaine C-terminal du récepteur AT2R avec le domaine C-terminal du récepteur AT1R qui n'est pas sensible à la mycolactone.

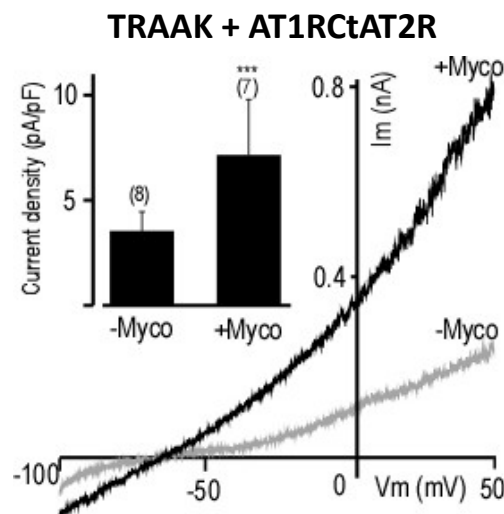


Figure 55 : Le domaine C-terminal d'AT2R est impliqué dans la régulation de TRAAK par la mycolactone. Effet de la mycolactone sur le courant TRAAK en présence de la protéine chimère AT1R/CtAT2R. Les courants ont été obtenus par une rampe dépolarisante de -100 à 50 mV en 800ms. L'histogramme en insert montre la moyenne des densités de courant obtenues à 0mV. Un test Mann-Whitney qu'il y a une différence significative ($***p < 0,001$) entre la condition avec et sans mycolactone. Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de cellules enregistrées.

Nous avons alors obtenu le récepteur suivant: AT1RCtAT2R. On peut observer qu'en présence de celui-ci la mycolactone est capable d'activer TRAAK démontrant ainsi l'implication de ce domaine (Figure 55). Il y a une différence significative ($p < 0,001$) entre la condition sans mycolactone ($3,54 \pm 0,32$ pA/pF) et la condition avec mycolactone ($7,15 \pm 1,00$ pA/pF).

II.3.4.3 Conclusion

Cette série d'expériences nous ont permis de caractériser le mécanisme d'action de la mycolactone. Tout d'abord, nous avons montré que la mycolactone peut activer le canal TRAAK *via* le récepteur AT2R dans un système d'expression hétérologue. Nous n'avons pas observé de désensibilisation du courant au court du temps, l'effet de la mycolactone

pouvant être observé deux heures après l'incubation. Ce résultat a été confirmé par la plateforme ARPEGE qui grâce à des expériences de fluorescences a pu montrer une absence d'internalisation du récepteur suite à la fixation de la mycolactone. Enfin, malgré plusieurs lavages, le récepteur reste potentialisé au moins une heure. Ces résultats sont cohérents avec l'observation que l'on peut faire chez les patients atteints de l'ulcère de Buruli, l'absence de douleur est pérenne dans le temps, celle-ci n'apparaissant que lors du traitement faisant disparaître les bactéries et la toxine. Cette propriété est très intéressante car la plupart des traitements contre la douleur, notamment les opioïdes, montrent rapidement des signes d'accoutumance entre autres due à une internalisation du récepteur.

Nous avons ensuite déterminé si les ligands connus d'AT2R pouvaient agir sur le canal TRAAK. Il est apparu que TRAAK n'est pas sensible au ligant naturel d'AT2R, l'angiotensine II, en présence ou non du récepteur. De plus l'EMA401 un inhibiteur d'AT2R n'a pas d'effet sur le canal TRAAK en présence de mycolactone. Ces résultats indiquent que la toxine agit *via* une voie de signalisation différente de l'angiotensine II.

En testant le Composé 21 (C21), un agoniste non peptidique d'AT2R, nous avons observé des résultats particuliers. En effet, en présence du récepteur le C21 inhibe le courant TRAAK et reverse les effets de la mycolactone. Cela est étonnant car étant un agoniste d'AT2R et au vu des effets des autres composés testés, on aurait pu s'attendre une absence d'effet de cette molécule sur TRAAK. Étant donné que le C21 est une molécule non peptidique (tout comme la mycolactone), on peut émettre l'hypothèse qu'il se fixe sur le même site que la mycolactone mais n'induit pas la même voie de signalisation. Des expériences de fixation seront nécessaires pour clarifier le mécanisme d'action du C21.

Au vu de ces résultats, la mycolactone agit *via* un mécanisme différent de celui des ligands connus du récepteur AT2R. Une autre voie de signalisation dite non canonique serait impliquée. La suite du projet s'est focalisée sur cette voie particulière.

Dans un premier temps, nous avons testé l'implication des protéines G. On a pu observer que la mycolactone peut activer TRAAK en présence de toxine pertussique (PTX), un inhibiteur des protéines Gi. Ce résultat a été confirmé en testant l'effet de la mycolactone sur un canal sensible aux protéines G, TREK-1. Le courant de celui-ci n'est pas modifié par la toxine. Ce résultat a été confirmé par la plateforme ARPEGE qui a montré une absence de dissociation de la protéine G en présence de mycolactone. Ces résultats semblent être en désaccord avec ceux obtenus *in vivo* précédemment (Article-3), ce point reste à éclaircir.

Nous avons observé que le canal TREK-1 n'est pas sensible à la mycolactone pourtant il est sensible au PGE₂. Or, nous avons vu précédemment que la toxine induit la production de ce second messager. Nous avons émis l'hypothèse que la mycolactone peut spécifiquement réguler TRAAK *via* AT2R grâce à la restriction spatiale de la voie de signalisation.

Grace à une expérience d'électrophysiologie en configuration cellule attachée nous avons pu tester cette hypothèse. Cette configuration permet d'isoler un morceau de membrane du milieu extracellulaire. Grace à cette technique, on a observé que les canaux présents au niveau de la pipette de patch ne sont pas activés lorsque la mycolactone est appliquée. Donc la voie de signalisation induite par la toxine est restreinte spatialement. A partir de là, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y a une interaction entre le récepteur et le canal. Une expérience de co-immunoprécipitation réalisée par l'équipe de Pricille Brodin a permis de mettre en évidence que le canal TRAAK pouvait être co-immunoprécipité lorsqu'il est co-exprimé avec AT2R. Cela indique que le canal et le récepteur interagissent. Cependant nous ne pouvons pas encore être certains que cette interaction soit directe. Des expériences complémentaires en molécules unique (SiMPull) ou de fluorescences (Transfert d'énergie entre molécules fluorescentes ou FRET, Bimoléculaire complémentation de fluorescence) doivent être réalisées pour répondre à cette question.

Pour finir nous avons voulu savoir quels domaines du canal et du récepteur sont impliqués dans cette régulation. Nous avons testé les domaines C-terminaux de ces protéines car ils sont connus pour être impliqués dans les régulations protéines/protéines. Pour l'instant, il n'a pas été décrit de partenaire protéique pour TRAAK, pourtant les autres membres de la sous-famille (TREK-1 et TREK-2) sont connus pour avoir de tels partenaires. Par exemple TREK-1, *via* son domaine C-terminal interagit avec la protéine AKAP 150 (Sandoz et al., 2006), la protéine MAP2 (Sandoz et al., 2008) et la PLD2 (Comoglio et al., 2014). En ce qui concerne AT2R, il est connu que la partie C-terminal des récepteurs couplés aux protéines G joue un rôle crucial dans leur interaction avec les autres protéines (Bockaert et al., 2003). Grâce à des protéines chimères, nous avons pu mettre en évidence l'implication de ces domaines dans le mécanisme d'action de la mycolactone sur le complexe AT2R/TRAAK. Ainsi, le transfert du domaine C-terminal de TRAAK sur le canal TREK-1 permet de transférer la sensibilité au mycolactone en présence d'AT2R. De même, le transfert du C-terminal d'AT2R sur AT1R permet de transférer la capacité à activer le canal TRAAK en présence de mycolactone.

Ce projet nous a permis de caractériser le mécanisme d'action de la mycolactone. Cependant plusieurs points restent à éclaircir. Par exemple, quel est le signal endogène permettant d'activer la voie de signalisation potentialisant TRAAK ?

III Discussion

III.1 TREK-1 et PLD2

Lors de ma thèse nous avons pu mettre en évidence qu'une partie des canaux TREK-1 et des hétéromères TREK-1-TRAAK sont constamment activés par la phospholipase D2. Cette régulation explique pourquoi TREK-1 est sensible à l'éthanol. En présence d'alcool primaire la PLD2 ne produit plus d'acide phosphatidique mais du phosphatidyléthanol. Ce métabolite non chargé n'est pas dégradé par la cellule et s'accumule. Il y a destruction du microenvironnement riche en AP: le canal TREK-1 n'est alors plus potentialisé. Une perte d'activité de TREK-1 dans les neurones induit une dépolarisation de ceux-ci et donc une augmentation de leur excitabilité.

III.1.1 Potentiel implication dans l'addiction

L'une des premières implications de ce mécanisme pourrait être dans l'addiction à alcool. L'alcoolisme est une maladie psychiatrique dans laquelle une prise abusive d'alcool sur le long terme induit des désordres corporels, mentaux et sociaux.

L'addiction est fortement liée au système de récompense. C'est un système complexe qui fait intervenir de nombreuses structures et neurotransmetteurs (Figure 56). Celui-ci fait partie du système limbique. Il commence au niveau des cellules dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. Leur axone projette principalement au niveau du noyau d'accumbens dans le striatum ventral mais aussi au niveau de l'amygdale et du noyau du lit de la strie terminale. Lors d'une expérience de récompense la voie mésolimbique dopaminergique est activée et on observe alors une augmentation de la concentration en dopamine extracellulaire au niveau du noyau d'accumbens. Celle-ci est exacerbée dans le cas des composés addictifs.

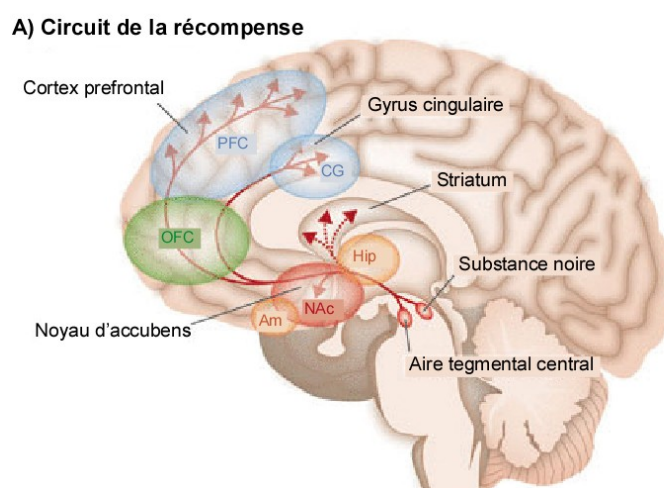


Figure 56: Schéma du circuit de la récompense. Figure montrant les structures impliquées dans le circuit de la récompense. Le noyau d'accumbens (Nac) joue un rôle central en modulant les sensations d'envies. Il reçoit entre autre des afférences de l'aire tegmentale ventrale puis projette des axones vers le cortex orbitofrontal (OFC), le cortex préfrontal (PFC) et le gyrus cingulaire (CG). C'est l'activation importante du noyau d'accumbens lors de l'addiction qui augmente l'envie et le comportement de prise de drogue. Modifier à partir de Lee et al., 2012.

Le fait que TREK-1 soit exprimé dans le noyau d'accumbens (Talley et al., 2001) et qu'il soit sensible à l'éthanol nous laisse penser que ce canal pourrait être impliqué dans les mécanismes de l'addiction. Ce noyau est un point central du circuit de la récompense, principalement activé par les afférences dopaminergiques de l'aire tegmentale ventrale. On associe cette structure à l'auto administration d'une drogue (Di Chiara et al., 2004), son activation et l'augmentation des niveaux de dopamine accroît les sensations "d'envie" des patients (Adinoff, 2004). TREK-1 pourrait jouer un rôle à ce niveau en rendant le noyau d'accumbens plus sensible lors de la prise d'alcool. On peut émettre l'hypothèse qu'en inhibant TREK-1, l'alcool dépolarise les neurones de cette structure, rendant ainsi les cellules plus excitables. Cela combiné avec les niveaux importants de dopamines, le noyau d'accumbens aurait une activité plus importante, exacerbant la sensation d'envie et de manque.

Il serait intéressant de tester le canal dans les neurones de ce noyau. Tout d'abord en testant l'addiction chez les souris TREK-1^{-/-}. On peut s'attendre à ce que ces souris soient plus sujettes aux addictions. Ensuite les techniques d'optogénétiques seraient tout à fait appropriées pour déterminer les mécanismes d'action de TREK-1. Grâce à une souris *Knock in* possédant de manière endogène le canal TREK-1 sensible à la lumière (TREKLight), on pourrait tester la prise d'alcool en fonction de l'activité du canal dans le noyau d'accumbens.

III.1.2 Implication dans la croissance

Un rôle possible de cette interaction est la croissance cellulaire. En effet, dans un premier temps la surexpression de TREK-1 dans des systèmes d'expression comme les cellules COS entraîne un remodelage du cytosquelette d'actine (Lauritzen et al., 2005). Ce remodelage induit la formation de microvili. De plus il a été proposé que le canal TREK-1 est un homologue fonctionnel du canal potassique de type S de l'aplysie, trouvé dans les cônes de croissance des neurones sensoriels (Patel et al., 1998). Ainsi la présence de TREK-1 dans ces excroissances permettrait l'hyperpolarisation locale de la membrane et la modulation de l'entrée de calcium. Cela jouerait un rôle important dans le guidage de la croissance axonale. La PLD2 est, comme TREK-1, impliquée dans la formation de microvili et est aussi localisée dans les cônes de croissance où elle jouerait un rôle dans la croissance neuritique dépendante du cytosquelette (Sung et al., 2001). D'autre part la PLD2 est exprimée de manière importante pendant la croissance neurale post-natale (Klein, 2005). Ainsi la régulation de TREK-1 par la PLD2 pourrait donc permettre de contrôler finement la croissance axonale lors de la neurogénèse.

III.2 Hétéromérisation

Nous avons vu que les canaux de la sous-famille TREK peuvent hétéromériser entre eux. Cela permet de former des canaux avec de nouvelles propriétés physicochimiques et de nouvelles régulations comme par exemple une sensibilité particulière au pH extra- et intracellulaire. Cette étude nous a montré que la sensibilité au pH des sous-unités des canaux TREK ne

s'annule pas, laissant penser que chacune contrôle les différentes portes du canal de manière indépendante.

III.2.1 TREK-1/TREK-2 un nouveau senseur du pH extracellulaire

Les changements de pH extracellulaire peuvent advenir dans des conditions physiologiques ou pathologiques. La libération de neurotransmetteurs peut acidifier l'espace extra-synaptique, de même qu'une forte activité neuronale. Egalement de nombreuses situations pathologiques peuvent modifier le pH extracellulaire telles que les attaques vasculaires cérébrales, l'épilepsie, l'anoxie, l'inflammation ou encore les tumeurs.

L'hétéromère TREK-1/TREK-2 possède un minimum d'activité à pH physiologique tandis qu'une acidification ou une alcalinisation permettent d'activer ce canal. Cette activation entrainera une hyperpolarisation de la cellule soit une diminution de sa sensibilité ou de son activité. On pourrait penser qu'un tel canal aurait un rôle dans des mécanismes de rétrocontrôle, évitant l'emballement d'un système. Il pourrait aussi avoir un rôle dans la levée d'une inhibition en fonction de la modification du pH. Par exemple il a été montré que l'acidose et l'alcalose du milieu extracellulaire diminuent l'activité des neurones corticaux GABAergiques (Zhang et al., 2013). TREK-1 et TREK-2 étant exprimés dans ce type de neurones (Deng et al., 2009b; Hervieu et al., 2001), leur hétéromérisation pourrait être impliquée dans la sensibilité de ces neurones au changement de pH extracellulaire.

III.2.2 Implication de l'hétéromérisation des K_{2P} .

Pendant longtemps l'hétéromérisation des canaux potassiques à deux domaines pores est restée peu étudiée. Cependant, ces dernières années, grâce aux nouvelles techniques d'étude des complexes protéiques, ce mécanisme est de mieux en mieux caractérisé, ouvrant la porte à un nouveau pan de la recherche. L'hétéromérisation des K_{2P} a plusieurs conséquences.

Tout d'abord cela pourra nous donner une meilleure compréhension des mécanismes de "gating" de ces canaux. Il est apparu que les hétéromères possèdent de nouvelles régulations qui sont en générale la somme des régulations des sous-unités qui les composent. Par exemple, la sensibilité de l'hétéromère TREK-1/TREK-2 au pH extracellulaire est un mélange de la sensibilité de la sous-unité TREK-1 et de la sous-unité TREK-2. Les régulations d'une sous-unité ne prennent pas le dessus sur l'autre chaque sous-unité pouvant contrôler le canal, portant ainsi à croire que chacune peut réguler les "portes" du canal de manière indépendante. L'étude cristallographique d'un hétéromère pourrait nous aider à mieux comprendre ces mécanismes.

Ensuite on peut s'attendre à ce que les hétéromères aient une sensibilité différente des homomères aux agents pharmacologiques. Par exemple l'hétéromère TASK-1/TASK-3 possède une sensibilité au *Ruthenium Red* différente des canaux TASK1 ou TASK3 (Czirják and Enyedi, 2002b). De même très récemment il a été montré que l'hétéromère TREK-

1/TRAAK possède une sensibilité moins importante à la fluoxétine et au ML67 (Blin et al., 2016). Ainsi il semble que certaines molécules n'auront pas le même effet dans les structures qui expriment deux sous-unités hétéromérisant.

Les K_{2P} se sont révélés des cibles potentielles dans plusieurs mécanismes physiopathologiques comme la douleur (Li and Toyoda, 2015), le cancer (Zhang et al., 2015a) et les ischémies (Ehling et al., 2015). De plus en plus de groupes de recherche développent des molécules pouvant moduler ces canaux, il sera dans l'avenir important de tester les effets de celles-ci également sur les hétéromères.

Enfin l'hétéromérisation de différentes sous-unités pourrait expliquer certaines pathologies. Il est déjà connu que des sous-unités mutantes ou des variants d'épissage peuvent jouer un rôle de dominant négatif. Par exemple le variant d'épissage de TREK-1, TREK-1 Δ Ex4 est capable d'inhiber le courant TREK-1 sauvage (Veale et al., 2010). Il serait intéressant d'étudier si certains de ces variants peuvent aussi inhiber d'autres sous-unités. De même, il est envisageable que certains mutants aient plus d'affinité pour une autre sous-unité.

Plusieurs points de l'hétéromérisation des K_{2P} restent incompris. Tout d'abord le lieu de réalisation de ce mécanisme. On sait que les K_{2P} possèdent un signal d'adressage à la membrane plasmique au niveau de leur domaine C-terminal. En l'absence de celui-ci le canal reste dans le réticulum endoplasmique. Néanmoins la présence d'une sous-unité possédant le signal est suffisante pour que tout l'hétéromère puisse être adressé à la membrane (Blin et al., 2014; Sandoz et al., 2012). Ces différentes observations suggèrent que le complexe se forme dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi.

Existe-t-il des motifs moléculaires permettant de déterminer si des canaux peuvent hétéromériser ou non ? Avec 15 membres, les K_{2P} peuvent théoriquement former 105 hétéromères différentes. Cependant nous savons déjà que tous les K_{2P} ne peuvent pas s'associer avec tous les autres. Par exemple nous avons montré que TREK-1 ne pouvait s'associer avec TASK1 et 3.

En 1996 Florian Lesage et ses collaborateurs proposèrent que les dimères s'assemblent covalamment *via* un pont disulfure entre les cystéines des domaines extracellulaires (Lesage et al., 1996b). Ce pont a été confirmé dans les études cristallographiques de TRAAK, TWIK-1 et TREK-2 (Brohawn et al., 2012; Dong et al., 2015; Miller and Long, 2012). On peut noter que cette cystéine est conservée chez TASK-2, TASK-4, TALK-1, TREK-1, TRESK, KCNK7 et TWIK-2. Toutefois, pour certains K_{2P} il existe des preuves que ce pont disulfure n'est pas nécessaire à la dimérisation du canal (Hwang et al., 2014; Niemeyer et al., 2003; Patel et al., 2000). Enfin les canaux TASK-1/3/5 et THIK-1/2 ne possèdent pas ce type de cystéines. Pourtant on peut noter que ceux sont les premiers K_{2P} caractérisés pour former des hétéromères. Au vu de tout cela le rôle de ce type de résidu au niveau des domaines extracellulaires dans les mécanismes d'hétéromérisation reste discutable.

Plusieurs études tentent de déterminer les caractéristiques des interfaces entre les protéines, soit de même nature (Nishi et al., 2013) soit de nature différentes (Vaishnavi et al., 2010; Zhanhua et al., 2005). Par exemple dans la mobilité structurale, la capacité des sous-unités à changer de conformation, la taille de la surface d'interface, l'hydrophobicité et la capacité à réaliser des liaisons seraient impliqués dans la formation des hétéromères en général (Nishi et al., 2013; Vaishnavi et al., 2010). Ces différents paramètres pourraient être étudiés pour prédire la capacité des K_{2p} à hétéromériser.

III.3 TRAAK et Mycolactone

Lors de ce projet nous avons mis en évidence l'implication du canal TRAAK dans l'effet d'une toxine analgésique la *Mycolactone*. Celle-ci *via* le récepteur de type 2 à l'angiotensine II est capable d'activer le canal induisant ainsi l'hyperpolarisation de la cellule nerveuse et la diminution de son excitabilité. Souvent utilisé comme contrôle dans les études sur TREK-1, TRAAK est bien moins caractérisé. De part ces régulations par la température et le l'étirement on peut considérer TRAAK comme un senseur des *stimuli* thermiques et mécaniques. Il est impliqué dans la perception de la douleur et plus particulièrement dans la modulation du seuil de perception de celle-ci (Li and Toyoda, 2015). Avant cette étude il n'était pas connu que ce canal puisse être modulé par des récepteurs et puisse être l'effecteur d'une voie de signalisation.

Il est apparu que l'activation de TRAAK par la mycolactone *via* le récepteur AT2R était due à une voie de signalisation non canonique. Celle-ci étant indépendante des protéines G et restreinte spatialement grâce à l'interaction entre le canal et le récepteur. Cela indiquerait que la régulation de TRAAK par AT2R serait indépendante de second messagers qui peuvent diffuser à distance. On pourrait penser à un mécanisme proche de la régulation de certains canaux GIRK par les GPCR. Dans ce mécanisme les sous-unité $\beta\gamma$ lient directement le canal et permettent de l'activer (Krapivinsky et al., 1995).

Ce mécanisme fait de la mycolactone un bon candidat pour le traitement de la douleur. L'interaction TRAAK/AT2R, l'implication d'une voie de signalisation non canonique pérenne dans le temps et sa restriction spatiale, laisse penser qu'un traitement basé sur cette toxine aura peu d'effets secondaires et d'accoutumance.

IV Perspectives

Malgré les nombreuses études déjà réalisées sur la sous-famille TREK, il est apparu lors de cette thèse que les canaux TREK ont encore beaucoup de secrets. Toutes leurs régulations sont loin d'être entièrement connues, sachant que chaque nouvelle régulation les implique dans un nouveau rôle physiologique.

La sensibilité de TREK-1 et TREK-2 à l'éthanol les implique potentiellement dans les effets de l'alcool, dans le comportement de la prise d'alcool et dans l'addiction. On pourrait donc étudier leur implication dans cette pathologie. Tout d'abord en étudiant leur activité dans les structures impliquées dans l'addiction comme le noyau d'accumbens. L'utilisation des outils optogénétiques permettront de répondre à ces questions. Récemment Guillaume Sandoz a développé une souris transgénique nommée StarTREK permettant d'observer le courant TREK-1 endogène grâce à la lumière. C'est une souris *Knock In* où le canal sauvage a été remplacé par sa version sensible à la lumière. Ainsi tous les canaux TREK-1 de l'organisme auront les mêmes caractéristiques que les canaux sauvages mais pourront en plus être modulés par la lumière, facilitant alors leur étude dans les tissus natifs (Sandoz and Levitz, 2013). Cela permettra de caractériser les changements d'activité du canal en fonction de la prise d'alcool et d'être le point de départ d'une meilleure compréhension de cette pathologie ainsi que dans le développement de traitement à son encontre.

L'étude de l'effet de la mycolactone sur le canal TRAAK a permis de révéler que ce canal pouvait être régulé par la protéine AT2R, un récepteur couplé aux protéines G. C'est la première fois que l'on met en lumière ce type de modulation pour ce canal. Celle-ci est particulière et met en jeu l'interaction entre le canal et le récepteur. On peut imaginer que TRAAK est peut être lié à d'autres protéines de ce type. Des expériences de co-immunoprécipitation suivies de spectrométrie de masse permettraient de révéler d'autres partenaires de même nature. Ces complexes pourraient avoir des rôles dans la transmission synaptique où l'activation/inhibition de TRAAK par certains neurotransmetteurs permettrait de contrôler l'excitabilité de la synapse.

Dans les projets cités précédemment il faut cependant tenir compte de la capacité des canaux TREK à hétéromériser. En effet, la caractérisation de ce mécanisme chez la sous-famille TREK n'est que la première partie d'un nouveau pan de la recherche sur les K_{2P} . Ce mécanisme ne semble pas rare chez ces canaux et de nouvelles questions se posent. Nous avons vu que l'hétéromère TREK-1/TREK-2 a autant de chance de se former que l'homomère TREK-1/TREK-1 ou TREK-2/TREK-2. Cela pose la question suivante: pourquoi deux protéines différentes ont autant de chance de s'assembler entre elles qu'avec elle-même? Pour commencer à répondre à cette question il serait intéressant d'étudier si l'hétéromère se forme lors de la synthèse de la protéine ou après celle-ci. Deux mécanismes sont envisageables: tout d'abord les deux sous-unités sont synthétisées en même temps, leur repliement se faisant pendant la traduction. Le second mécanisme serait la synthèse

indépendante de chaque sous-unité, celles-ci s'assemblant plus tard dans le réticulum ou l'appareil de Golgi. On pourrait tester ces mécanismes grâce à des expériences de complémentation biomoléculaire ou de FRET. Ces deux techniques de microscopie permettent d'observer l'assemblage de deux sous-unités. En se focalisant sur les organelles il serait possible de savoir où se réalise l'assemblage du canal.

Une fois les modalités de l'hétéromérisation caractérisées, il serait intéressant d'étudier si celles-ci peuvent changer lors de mécanismes physiopathologiques. Il est déjà connu que TREK-1 peut être régulé par la production d'un variant d'épissage qui va l'inhiber (Cowles et al., 2015b). Il est donc possible qu'une sous-unité en module une autre suivant le type cellulaire et la condition pathologique ou non. L'étude en SiMPull à partir de tissu natif, permettrait de définir les proportions d'hétéromères et de caractériser si elles changent en fonction des conditions physiologiques ou pathologiques telle que la dépression.

Pour conclure, pendant longtemps les limitations techniques ont rendu impossible de répondre à certaines questions concernant les canaux TREK tant au niveau mécanistique que physiologique. Mais le développement récent de l'optogénétique ainsi que des techniques en molécule unique permettront de lever le voile sur le rôle de ces canaux dans des mécanismes comme l'addiction, la mémoire et la transmission synaptique.

Liste des publications

Marion E, Song OR, Christophe T, Babonneau J, Fenistein D, Eyer J, Letournel F, Henrion D, Clere N, Paille V, Guérineau NC, Saint André JP, Gersbach P, Altmann KH, Stinear TP, **Comoglio Y**, Sandoz G, Preisser L, Delneste Y, Yeramian E, Marsollier L, Brodin P. *Mycobacterial toxin induces analgesia in buruli ulcer by targeting the Angiotensin pathways*. **Cell**. 2014 Jun 19;157 (7):1565-76. PMID: 24949969

Yannick Comoglio, Joshua Levitz, Michael A. Kienzler, Florian Lesage, Ehud Y. Isacoff and Guillaume Sandoz. *Specific regulation of TREK channels by phosphatidic acid due to direct association with Phospholipase D2*. **PNAS** 2014 Sep 16;111(37):13547-52. doi: 10.1073/pnas.1407160111. PMID:25197053

Song OR, Marion E, **Comoglio Y**, Babonneau J, Guérineau N, Sandoz G, Yeramian E, Brodin P, Marsollier L. *Mycolactone: the amazing analgesic mycobacterial toxin*. **Med Sci (Paris)**. 2016 Feb;32(2):156-8. doi: 10.1051/medsci/20163202007

Levitz J, Royal P*, **Comoglio Y**, Wdziekonski B, Schaub S, Clemens DM, Isacoff EY, Sandoz G. *Heterodimerization within the TREK channel subfamily produces a diverse family of highly regulated potassium channels*. **PNAS** 2016 Mar 28. pii: 201522459

Liste des brevets

Sandoz G (70%) and **Comoglio Y** (30%). METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING DRUG ADDICTION. 22/08/2014. EP14306304.8, WO 2016026978 A1 (Annexe 1)

Marion E (3%), Song Ok-Ryul (3%), **Comoglio Y** (3%), Marsollier L (30%), Sandoz G (30%) and Brodin P (31%). METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING PAIN. L'INSERM transfère à breveté l'invention le 14 juin 2014. EP14305901.2, WO 2015189342 A1 (Annexe 2)

Bibliographie

- Acosta, C., Djouhri, L., Watkins, R., Berry, C., Bromage, K., and Lawson, S.N. (2014). TREK2 Expressed Selectively in IB4-Binding C-Fiber Nociceptors Hyperpolarizes Their Membrane Potentials and Limits Spontaneous Pain. *J. Neurosci.* *34*, 1494–1509.
- Adams, P.R., Constanti, A., Brown, D.A., and Clark, R.B. (1982). Intracellular Ca²⁺ activates a fast voltage-sensitive K⁺ current in vertebrate sympathetic neurones. *Nature* *296*, 746–749.
- Adinoff, B. (2004). Neurobiologic Processes in Drug Reward and Addiction. *Harv. Rev. Psychiatry* *12*, 305–320.
- Aggarwal, S.K., and MacKinnon, R. (1996). Contribution of the S4 Segment to Gating Charge in the Shaker K⁺ Channel. *Neuron* *16*, 1169–1177.
- Alam, A., and Jiang, Y. (2011). Structural studies of ion selectivity in tetrameric cation channels. *J. Gen. Physiol.* *137*, 397–403.
- Aller, M.I., and Wisden, W. (2008). Changes in expression of some two-pore domain potassium channel genes (KCNK) in selected brain regions of developing mice. *Neuroscience* *151*, 1154–1172.
- Alloui, A., Zimmermann, K., Mamet, J., Duprat, F., Noël, J., Chemin, J., Guy, N., Blondeau, N., Voilley, N., Rubat-Coudert, C., et al. (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *EMBO J.* *25*, 2368–2376.
- Anand, U., Facer, P., Yiangou, Y., Sinisi, M., Fox, M., McCarthy, T., Bountra, C., Korchev, Y., and Anand, P. (2013). Angiotensin II type 2 receptor (AT2R) localization and antagonist-mediated inhibition of capsaicin responses and neurite outgrowth in human and rat sensory neurons. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *17*, 1012–1026.
- Añazco, C., Peña-Münzenmayer, G., Araya, C., Cid, L.P., Sepúlveda, F.V., and Niemeyer, M.I. (2013). G protein modulation of K2P potassium channel TASK-2 : a role of basic residues in the C terminus domain. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *465*, 1715–1726.
- Ashcroft, F.M., and Rorsman, P. (1989). Electrophysiology of the pancreatic β -cell. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* *54*, 87–143.
- Ashmole, I., Goodwin, P.A., and Stanfield, P.R. (2001). TASK-5, a novel member of the tandem pore K⁺ channel family. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *442*, 828–833.
- Bagriantsev, S.N., Peyronnet, R., Clark, K.A., Honoré, E., and Minor, D.L. (2011). Multiple modalities converge on a common gate to control K2P channel function. *EMBO J.* *30*, 3594–3606.
- Bagriantsev, S.N., Clark, K.A., and Minor, D.L. (2012). Metabolic and thermal stimuli control K(2P)2.1 (TREK-1) through modular sensory and gating domains. *EMBO J.* *31*, 3297–3308.
- Bagriantsev, S.N., Ang, K.-H., Gallardo-Godoy, A., Clark, K.A., Arkin, M.R., Renslo, A.R., and Minor, D.L. (2013). A high-throughput functional screen identifies small molecule regulators of temperature- and mechano-sensitive K2P channels. *ACS Chem. Biol.* *8*, 1841–1851.
- Bando, Y., Hirano, T., and Tagawa, Y. (2014). Dysfunction of KCNK potassium channels impairs neuronal migration in the developing mouse cerebral cortex. *Cereb. Cortex N. Y. N 1991* *24*, 1017–1029.
- Bang, H., Kim, Y., and Kim, D. (2000). TREK-2, a new member of the mechanosensitive tandem-pore K⁺ channel family. *J. Biol. Chem.* *275*, 17412–17419.
- Barriere, H., Belfodil, R., Rubera, I., Tauc, M., Lesage, F., Poujeol, C., Guy, N., Barhanin, J., and Poujeol, P. (2003). Role of TASK2 potassium channels regarding volume regulation in primary cultures of mouse proximal tubules. *J. Gen. Physiol.* *122*, 177–190.

- Bautista, D.M., Sigal, Y.M., Milstein, A.D., Garrison, J.L., Zorn, J.A., Tsuruda, P.R., Nicoll, R.A., and Julius, D. (2008). Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. *Nat. Neurosci.* *11*, 772–779.
- Bayliss, D.A., Talley, E.M., Sirois, J.E., and Lei, Q. (2001). TASK-1 is a highly modulated pH-sensitive “leak” K(+) channel expressed in brainstem respiratory neurons. *Respir. Physiol.* *129*, 159–174.
- Bernèche, S., and Roux, B. (2001). Energetics of ion conduction through the K⁺ channel. *Nature* *414*, 73–77.
- Bertaccini, E.J., Dickinson, R., Trudell, J.R., and Franks, N.P. (2014). Molecular modeling of a tandem two pore domain potassium channel reveals a putative binding site for general anesthetics. *ACS Chem. Neurosci.* *5*, 1246–1252.
- Bhattacharjee, A., and Kaczmarek, L.K. (2005). For K⁺ channels, Na⁺ is the new Ca²⁺. *Trends Neurosci.* *28*, 422–428.
- Bichet, D., Blin, S., Feliciangeli, S., Chatelain, F.C., Bobak, N., and Lesage, F. (2015). Silent but not dumb: how cellular trafficking and pore gating modulate expression of TWIK1 and THIK2. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *467*, 1121–1131.
- Bittner, S., Ruck, T., Schuhmann, M.K., Herrmann, A.M., Moha ou Maati, H., Bobak, N., Göbel, K., Langhauser, F., Stegner, D., Ehling, P., et al. (2013). Endothelial TWIK-related potassium channel-1 (TREK1) regulates immune-cell trafficking into the CNS. *Nat. Med.* *19*, 1161–1165.
- Blin, S., Chatelain, F.C., Feliciangeli, S., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2014). Tandem Pore Domain Halothane-inhibited K⁺ Channel Subunits THIK1 and THIK2 Assemble and Form Active Channels. *J. Biol. Chem.* *289*, 28202–28212.
- Blin, S., Ben Soussia, I., Kim, E.-J., Brau, F., Kang, D., Lesage, F., and Bichet, D. (2016). Mixing and matching TREK/TRAAK subunits generate heterodimeric K²P channels with unique properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, 4200–4205.
- Blondeau, N., Pétrault, O., Manta, S., Giordanengo, V., Gounon, P., Bordet, R., Lazdunski, M., and Heurteaux, C. (2007). Polyunsaturated Fatty Acids Are Cerebral Vasodilators via the TREK-1 Potassium Channel. *Circ. Res.* *101*, 176–184.
- Bockaert, J., Marin, P., Dumuis, A., and Fagni, L. (2003). The “magic tail” of G protein-coupled receptors: an anchorage for functional protein networks. *FEBS Lett.* *546*, 65–72.
- Bockaert, J., Perroy, J., Bécamel, C., Marin, P., and Fagni, L. (2010). GPCR interacting proteins (GIPs) in the nervous system: Roles in physiology and pathologies. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* *50*, 89–109.
- Bockenhauer, D., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A. (2001). KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat. Neurosci.* *4*, 486–491.
- Bocksteins, E. (2016). Kv5, Kv6, Kv8, and Kv9 subunits: No simple silent bystanders. *J. Gen. Physiol.* *147*, 105–125.
- Bond, C.T., Herson, P.S., Strassmaier, T., Hammond, R., Stackman, R., Maylie, J., and Adelman, J.P. (2004). Small Conductance Ca²⁺-Activated K⁺ Channel Knock-Out Mice Reveal the Identity of Calcium-Dependent Afterhyperpolarization Currents. *J. Neurosci.* *24*, 5301–5306.
- Borsook, D., Hargreaves, R., Bountra, C., and Porreca, F. (2014). Lost but making progress--Where will new analgesic drugs come from? *Sci. Transl. Med.* *6*, 249sr3.
- Braun, G., Lengyel, M., Enyedi, P., and Czirják, G. (2015). Differential sensitivity of TREK–1, TREK–2 and TRAAK background potassium channels to the polycationic dye ruthenium red. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 1728–1738.

- Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., and Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur. J. Pain Lond. Engl.* *10*, 287–333.
- Brohawn, S.G. (2015). How ion channels sense mechanical force: insights from mechanosensitive K2P channels TRAAK, TREK1, and TREK2. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1352*, 20–32.
- Brohawn, S.G., del Mármol, J., and MacKinnon, R. (2012). Crystal structure of the human K2P TRAAK, a lipid- and mechano-sensitive K⁺ ion channel. *Science* *335*, 436–441.
- Brohawn, S.G., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2013). Domain-swapped chain connectivity and gated membrane access in a Fab-mediated crystal of the human TRAAK K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 2129–2134.
- Brohawn, S.G., Su, Z., and MacKinnon, R. (2014a). Mechanosensitivity is mediated directly by the lipid membrane in TRAAK and TREK1 K⁺ channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 3614–3619.
- Brohawn, S.G., Campbell, E.B., and MacKinnon, R. (2014b). Physical mechanism for gating and mechanosensitivity of the human TRAAK K⁺ channel. *Nature* *516*, 126–130.
- Brown, A., Cornwell, T., Korniyenko, I., Solodushko, V., Bond, C.T., Adelman, J.P., and Taylor, M.S. (2007). Myometrial expression of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels depresses phasic uterine contraction. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *292*, C832–840.
- Browne, D.L., Gancher, S.T., Nutt, J.G., Brunt, E.R., Smith, E.A., Kramer, P., and Litt, M. (1994). Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. *Nat. Genet.* *8*, 136–140.
- Buckler, K.J., Williams, B.A., and Honore, E. (2000). An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J. Physiol.* *525 Pt 1*, 135–142.
- Buxton, I.L.O., Singer, C.A., and Tichenor, J.N. (2010). Expression of stretch-activated two-pore potassium channels in human myometrium in pregnancy and labor. *PLoS One* *5*, e12372.
- Buxton, I.L.O., Heyman, N., Wu, Y., Barnett, S., and Ulrich, C. (2011). A role of stretch-activated potassium currents in the regulation of uterine smooth muscle contraction. *Acta Pharmacol. Sin.* *32*, 758–764.
- Cadaveira-Mosquera, A., Ribeiro, S.J., Reboreda, A., Pérez, M., and Lamas, J.A. (2011). Activation of TREK currents by the neuroprotective agent riluzole in mouse sympathetic neurons. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 1375–1385.
- Cadaveira-Mosquera, A., Pérez, M., Reboreda, A., Rivas-Ramírez, P., Fernández-Fernández, D., and Lamas, J.A. (2012). Expression of K2P channels in sensory and motor neurons of the autonomic nervous system. *J. Mol. Neurosci. MN* *48*, 86–96.
- Cain, S.M., Meadows, H.J., Dunlop, J., and Bushell, T.J. (2008). mGlu4 potentiation of K(2P)2.1 is dependant on C-terminal dephosphorylation. *Mol. Cell. Neurosci.* *37*, 32–39.
- Campanucci, V.A., Fearon, I.M., and Nurse, C.A. (2003). A novel O₂-sensing mechanism in rat glossopharyngeal neurones mediated by a halothane-inhibitable background K⁺ conductance. *J. Physiol.* *548*, 731–743.
- Cang, C., Aranda, K., Seo, Y., Gasnier, B., and Ren, D. (2015). TMEM175 Is an Organelle K(+) Channel Regulating Lysosomal Function. *Cell* *162*, 1101–1112.
- Cazzolli, R., Shemon, A.N., Fang, M.Q., and Hughes, W.E. (2006). Phospholipid signalling through phospholipase D and phosphatidic acid. *IUBMB Life* *58*, 457–461.
- Center régional de pharmacovigilance de Grenoble (2013). Effets indésirables du baclofène dans le traitement des addictions - Suivi national pharmacovigilance.

- Chandy, K.G., Cahalan, M., Pennington, M., Norton, R.S., Wulff, H., and Gutman, G.A. (2001). Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. *Toxicol. Off. J. Int. Soc. Toxicology* *39*, 1269–1276.
- Chapman, C.G., Meadows, H.J., Godden, R.J., Campbell, D.A., Duckworth, M., Kellsell, R.E., Murdock, P.R., Randall, A.D., Rennie, G.I., and Gloger, I.S. (2000). Cloning, localisation and functional expression of a novel human, cerebellum specific, two pore domain potassium channel. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *82*, 74–83.
- Chatelain, F.C., Bichet, D., Douguet, D., Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Reichold, M., Warth, R., Barhanin, J., and Lesage, F. (2012). TWIK1, a unique background channel with variable ion selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 5499–5504.
- Chatelain, F.C., Bichet, D., Feliciangeli, S., Larroque, M.-M., Braud, V.M., Douguet, D., and Lesage, F. (2013). Silencing of the Tandem Pore Domain Halothane-inhibited K⁺ Channel 2 (THIK2) Relies on Combined Intracellular Retention and Low Intrinsic Activity at the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* *288*, 35081–35092.
- Chemin, J., Girard, C., Duprat, F., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2003). Mechanisms underlying excitatory effects of group I metabotropic glutamate receptors via inhibition of 2P domain K⁺ channels. *EMBO J.* *22*, 5403–5411.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Lauritzen, I., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2005a). A phospholipid sensor controls mechanogating of the K⁺ channel TREK-1. *EMBO J.* *24*, 44–53.
- Chemin, J., Patel, A., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2005b). Lysophosphatidic Acid-operated K⁺ Channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 4415–4421.
- Chemin, J., Patel, A.J., Duprat, F., Sachs, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2007a). Up- and down-regulation of the mechano-gated K(2P) channel TREK-1 by PIP (2) and other membrane phospholipids. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *455*, 97–103.
- Chemin, J., Patel, A.J., Delmas, P., Sachs, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2007b). Regulation of the Mechano-Gated K2P Channel TREK-1 by Membrane Phospholipids. *Curr. Top. Membr.* *59*, 155–170.
- Chiu, A.T., Herblin, W.F., McCall, D.E., Ardecky, R.J., Carini, D.J., Duncia, J.V., Pease, L.J., Wong, P.C., Wexler, R.R., and Johnson, A.L. (1989). Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *165*, 196–203.
- Clement, J.P., Kunjilwar, K., Gonzalez, G., Schwanstecher, M., Panten, U., Aguilar-Bryan, L., and Bryan, J. (1997). Association and Stoichiometry of KATP Channel Subunits. *Neuron* *18*, 827–838.
- Colley, W.C., Sung, T.C., Roll, R., Jenco, J., Hammond, S.M., Altshuler, Y., Bar-Sagi, D., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (1997). Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr. Biol. CB* *7*, 191–201.
- Comoglio, Y., Levitz, J., Kienzler, M.A., Lesage, F., Isacoff, E.Y., and Sandoz, G. (2014). Phospholipase D2 specifically regulates TREK potassium channels via direct interaction and local production of phosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *111*, 13547–13552.
- Cordero-Morales, J.F., Cuello, L.G., Zhao, Y., Jogini, V., Cortes, D.M., Roux, B., and Perozo, E. (2006). Molecular determinants of gating at the potassium-channel selectivity filter. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 311–318.
- Cowles, C.L., Wu, Y.-Y., Barnett, S.D., Lee, M.T., Burkin, H.R., and Buxton, I.L.O. (2015a). Alternatively Spliced Human TREK-1 Variants Alter TREK-1 Channel Function and Localization. *Biol. Reprod.* *93*, 122.

- Cowles, C.L., Wu, Y.-Y., Barnett, S.D., Lee, M.T., Burkin, H.R., and Buxton, I.L.O. (2015b). Alternatively Spliced Human TREK-1 Variants Alter TREK-1 Channel Function and Localization. *Biol. Reprod.* *93*, 122.
- Cuiling Liu, Ching-Yuen Ngai, Yu Huang, Wing-Hung Ko, Min Wu, Guo-Wei He, Garland, C.J., Dora, K.A., and Xiaoqiang Yao (2006). Depletion of intracellular Ca²⁺ stores enhances flow-induced vascular dilatation in rat small mesenteric artery. *Br. J. Pharmacol.* *147*, 506–515.
- Czirják, G., and Enyedi, P. (2002a). Formation of Functional Heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J. Biol. Chem.* *277*, 5426–5432.
- Czirják, G., and Enyedi, P. (2002b). Formation of Functional Heterodimers between the TASK-1 and TASK-3 Two-pore Domain Potassium Channel Subunits. *J. Biol. Chem.* *277*, 5426–5432.
- Czirják, G., and Enyedi, P. (2006). Zinc and mercuric ions distinguish TRESK from the other two-pore-domain K⁺ channels. *Mol. Pharmacol.* *69*, 1024–1032.
- Czirják, G., Fischer, T., Spät, A., Lesage, F., and Enyedi, P. (2000). TASK (TWIK-related acid-sensitive K⁺ channel) is expressed in glomerulosa cells of rat adrenal cortex and inhibited by angiotensin II. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *14*, 863–874.
- Czirják, G., Tóth, Z.E., and Enyedi, P. (2004). The two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is activated by the cytoplasmic calcium signal through calcineurin. *J. Biol. Chem.* *279*, 18550–18558.
- Czirják, G., Vuity, D., and Enyedi, P. (2008). Phosphorylation-dependent binding of 14-3-3 proteins controls TRESK regulation. *J. Biol. Chem.* *283*, 15672–15680.
- Danthi, S., Enyeart, J.A., and Enyeart, J.J. (2004). Caffeic acid esters activate TREK-1 potassium channels and inhibit depolarization-dependent secretion. *Mol. Pharmacol.* *65*, 599–610.
- Day, M., Carr, D.B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., and Surmeier, D.J. (2005). Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K_{leak} channels. *J. Neurosci.* *25*, 8776–8787.
- Decressac, S., Franco, M., Bendahhou, S., Warth, R., Knauer, S., Barhanin, J., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2004). ARF6-dependent interaction of the TWIK1 K⁺ channel with EFA6, a GDP/GTP exchange factor for ARF6. *EMBO Rep.* *5*, 1171–1175.
- Deng, P.-Y., Xiao, Z., Yang, C., Rojanathammanee, L., Grisanti, L., Watt, J., Geiger, J.D., Liu, R., Porter, J.E., and Lei, S. (2009a). GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K⁺ channels. *Neuron* *63*, 230–243.
- Deng, P.-Y., Xiao, Z., Yang, C., Rojanathammanee, L., Grisanti, L., Watt, J., Geiger, J.D., Liu, R., Porter, J.E., and Lei, S. (2009b). GABA(B) receptor activation inhibits neuronal excitability and spatial learning in the entorhinal cortex by activating TREK-2 K⁺ channels. *Neuron* *63*, 230–243.
- Descoeur, J., Pereira, V., Pizzoccaro, A., Francois, A., Ling, B., Maffre, V., Couette, B., Busserolles, J., Courteix, C., Noel, J., et al. (2011). Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors. *EMBO Mol. Med.* *3*, 266–278.
- Devader, C., Khayachi, A., Veyssi re, J., Moha Ou Maati, H., Roulot, M., Moreno, S., Borsotto, M., Martin, S., Heurteaux, C., and Mazella, J. (2015). In vitro and in vivo regulation of synaptogenesis by the novel antidepressant spadin. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 2604–2617.
- Devilliers, M., Busserolles, J., Lollignier, S., Deval, E., Pereira, V., Alloui, A., Christin, M., Mazet, B., Delmas, P., Noel, J., et al. (2013). Activation of TREK-1 by morphine results in analgesia without adverse side effects. *Nat. Commun.* *4*, 2941.

- Di Chiara, G., Bassareo, V., Fenu, S., De Luca, M.A., Spina, L., Cadoni, C., Acquas, E., Carboni, E., Valentini, V., and Lecca, D. (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection. *Neuropharmacology* 47, *Supplement 1*, 227–241.
- Diocot, S., Baron, A., Salinas, M., Douguet, D., Scarzello, S., Dabert-Gay, A.-S., Debayle, D., Friend, V., Alloui, A., Lazdunski, M., et al. (2012). Black mamba venom peptides target acid-sensing ion channels to abolish pain. *Nature* 490, 552–555.
- Dobler, T., Springauf, A., Tovornik, S., Weber, M., Schmitt, A., Sedlmeier, R., Wischmeyer, E., and Döring, F. (2007). TRESK two-pore-domain K⁺ channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones. *J. Physiol.* 585, 867–879.
- Donaldson, M.R., Jensen, J.L., Tristani-Firouzi, M., Tawil, R., Bendahhou, S., Suarez, W.A., Cobo, A.M., Poza, J.J., Behr, E., Wagstaff, J., et al. (2003). PIP2 binding residues of Kir2.1 are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 60, 1811–1816.
- Dong, Y.Y., Pike, A.C.W., Mackenzie, A., McClenaghan, C., Aryal, P., Dong, L., Quigley, A., Grieben, M., Goubin, S., Mukhopadhyay, S., et al. (2015). K2P channel gating mechanisms revealed by structures of TREK-2 and a complex with Prozac. *Science* 347, 1256–1259.
- Douppnik, C.A., Davidson, N., and Lester, H.A. (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr. Opin. Neurobiol.* 5, 268–277.
- Doyle, D.A., Morais Cabral, J., 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.
- Du, Y., Kiyoshi, C.M., Wang, Q., Wang, W., Ma, B., Alford, C.C., Zhong, S., Wan, Q., Chen, H., Lloyd, E.E., et al. (2016). Genetic Deletion of TREK-1 or TWIK-1/TREK-1 Potassium Channels does not Alter the Basic Electrophysiological Properties of Mature Hippocampal Astrocytes In Situ. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 13.
- Duprat, F., Lesage, F., Fink, M., Reyes, R., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997). TASK, a human background K⁺ channel to sense external pH variations near physiological pH. *EMBO J.* 16, 5464–5471.
- Duprat, F., Lesage, F., Patel, A.J., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). The neuroprotective agent riluzole activates the two P domain K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *Mol. Pharmacol.* 57, 906–912.
- Duprat, F., Girard, C., Jarretou, G., and Lazdunski, M. (2005). Pancreatic two P domain K⁺ channels TALK-1 and TALK-2 are activated by nitric oxide and reactive oxygen species. *J. Physiol.* 562, 235–244.
- Ehling, P., Cerina, M., Budde, T., Meuth, S.G., and Bittner, S. (2015). The CNS under pathophysiologic attack—examining the role of K_{2p} channels. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 959–972.
- English, D. (1996). Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell. Signal.* 8, 341–347.
- Enyeart, J.J., Xu, L., Danthi, S., and Enyeart, J.A. (2002). An ACTH- and ATP-regulated Background K⁺ Channel in Adrenocortical Cells Is TREK-1. *J. Biol. Chem.* 277, 49186–49199.
- Enyeart, J.J., Danthi, S.J., Liu, H., and Enyeart, J.A. (2005). Angiotensin II inhibits bTREK-1 K⁺ channels in adrenocortical cells by separate Ca²⁺- and ATP hydrolysis-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* 280, 30814–30828.
- Enyedi, P., and Czirják, G. (2010). Molecular Background of Leak K⁺ Currents: Two-Pore Domain Potassium Channels. *Physiol. Rev.* 90, 559–605.

- Enyedi, P., Braun, G., and Czirják, G. (2012). TRESK: the lone ranger of two-pore domain potassium channels. *Mol. Cell. Endocrinol.* *353*, 75–81.
- Feliciangeli, S., Bendahhou, S., Sandoz, G., Gounon, P., Reichold, M., Warth, R., Lazdunski, M., Barhanin, J., and Lesage, F. (2007). Does sumoylation control K2P1/TWIK1 background K⁺ channels? *Cell* *130*, 563–569.
- Feliciangeli, S., Tardy, M.P., Sandoz, G., Chatelain, F.C., Warth, R., Barhanin, J., Bendahhou, S., and Lesage, F. (2010). Potassium channel silencing by constitutive endocytosis and intracellular sequestration. *J. Biol. Chem.* *285*, 4798–4805.
- Fink, M., Duprat, F., Lesage, F., Reyes, R., Romey, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *EMBO J.* *15*, 6854–6862.
- Fink, M., Lesage, F., Duprat, F., Heurteaux, C., Reyes, R., Fosset, M., and Lazdunski, M. (1998). A neuronal two P domain K⁺ channel stimulated by arachidonic acid and polyunsaturated fatty acids. *EMBO J.* *17*, 3297–3308.
- Fisher, S.K., Novak, J.E., and Agranoff, B.W. (2002). Inositol and higher inositol phosphates in neural tissues: homeostasis, metabolism and functional significance. *J. Neurochem.* *82*, 736–754.
- Franks, N.P., and Honoré, E. (2004). The TREK K2P channels and their role in general anaesthesia and neuroprotection. *Trends Pharmacol. Sci.* *25*, 601–608.
- Franks, N.P., and Lieb, W.R. (1988). Volatile general anaesthetics activate a novel neuronal K⁺ current. *Nature* *333*, 662–664.
- Friedrich, C., Rinné, S., Zumhagen, S., Kiper, A.K., Silbernagel, N., Netter, M.F., Stallmeyer, B., Schulze-Bahr, E., and Decher, N. (2014). Gain-of-function mutation in TASK-4 channels and severe cardiac conduction disorder. *EMBO Mol. Med.* *6*, 937–951.
- Garry, A., Fromy, B., Blondeau, N., Henrion, D., Brau, F., Gounon, P., Guy, N., Heurteaux, C., Lazdunski, M., and Saumet, J.L. (2007). Altered acetylcholine, bradykinin and cutaneous pressure-induced vasodilation in mice lacking the TREK1 potassium channel: the endothelial link. *EMBO Rep.* *8*, 354–359.
- Gasparo, M. de, Catt, K.J., Inagami, T., Wright, J.W., and Unger, T. (2000). International Union of Pharmacology. XXIII. The Angiotensin II Receptors. *Pharmacol. Rev.* *52*, 415–472.
- Gestreau, C., Heitzmann, D., Thomas, J., Dubreuil, V., Bandulik, S., Reichold, M., Bendahhou, S., Pierson, P., Sterner, C., Peyronnet-Roux, J., et al. (2010). Task2 potassium channels set central respiratory CO₂ and O₂ sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 2325–2330.
- Girard, C., Duprat, F., Terrenoire, C., Tinel, N., Fosset, M., Romey, G., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2001). Genomic and functional characteristics of novel human pancreatic 2P domain K⁽⁺⁾ channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *282*, 249–256.
- Girard, C., Tinel, N., Terrenoire, C., Romey, G., Lazdunski, M., and Borsotto, M. (2002). p11, an annexin II subunit, an auxiliary protein associated with the background K⁺ channel, TASK-1. *EMBO J.* *21*, 4439–4448.
- Gnatenco, C., Han, J., Snyder, A.K., and Kim, D. (2002). Functional expression of TREK-2 K⁺ channel in cultured rat brain astrocytes. *Brain Res.* *931*, 56–67.
- Gola, M., and Romey, G. (1971). [Anomalous responses to subthreshold currents of certain somatic membranes (giant neurons of *Helix pomatia*). Voltage clamp analysis]. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *327*, 105–131.

- Goldstein, S.A.N., Price, L.A., Rosenthal, D.N., and Pausch, M.H. (1996). ORK1, a potassium-selective leak channel with two pore domains cloned from *Drosophila melanogaster* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 13256–13261.
- González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012). K(+) channels: function-structural overview. *Compr. Physiol.* *2*, 2087–2149.
- Goonetilleke, L., and Quayle, J. (2012). TREK-1 K⁺ Channels in the Cardiovascular System: Their Significance and Potential as a Therapeutic Target: TREK-1 K⁺ Channels in the CVS. *Cardiovasc. Ther.* *30*, e23–e29.
- Goto, M., Nakanaga, K., Aung, T., Hamada, T., Yamada, N., Nomoto, M., Kitajima, S., Ishii, N., Yonezawa, S., and Saito, H. (2006). Nerve damage in *Mycobacterium ulcerans*-infected mice: probable cause of painlessness in buruli ulcer. *Am. J. Pathol.* *168*, 805–811.
- Gray, A.T., Zhao, B.B., Kindler, C.H., Winegar, B.D., Mazurek, M.J., Xu, J., Chavez, R.A., Forsayeth, J.R., and Yost, C.S. (2000). Volatile anesthetics activate the human tandem pore domain baseline K⁺ channel KCNK5. *Anesthesiology* *92*, 1722–1730.
- Grissmer, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Karmilowicz, M.J., Auperin, D.D., and Chandy, K.G. (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* *45*, 1227–1234.
- Gruss, M., Bushell, T.J., Bright, D.P., Lieb, W.R., Mathie, A., and Franks, N.P. (2004). Two-pore-domain K⁺ channels are a novel target for the anesthetic gases xenon, nitrous oxide, and cyclopropane. *Mol. Pharmacol.* *65*, 443–452.
- Gu, W., Schlichthörl, G., Hirsch, J.R., Engels, H., Karschin, C., Karschin, A., Derst, C., Steinlein, O.K., and Daut, J. (2002). Expression pattern and functional characteristics of two novel splice variants of the two-pore-domain potassium channel TREK-2. *J. Physiol.* *539*, 657–668.
- Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., Mckinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., et al. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.* *57*, 473–508.
- Hammond, R.S., Bond, C.T., Strassmaier, T., Ngo-Anh, T.J., Adelman, J.P., Maylie, J., and Stackman, R.W. (2006). Small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel type 2 (SK2) modulates hippocampal learning, memory, and synaptic plasticity. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 1844–1853.
- Han, J., Kang, D., and Kim, D. (2003). Functional properties of four splice variants of a human pancreatic tandem-pore K⁺ channel, TALK-1. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *285*, C529–538.
- Hannuksela, M.L., Liisanantti, M.K., Nissinen, A.E.T., and Savolainen, M.J. (2007). Biochemical markers of alcoholism. *Clin. Chem. Lab. Med.* *45*, 953–961.
- Hansen, S.B. (2015). Lipid Agonism, The PIP2 Paradigm of Ligand-Gated Ion Channels. *Biochim. Biophys. Acta* *1851*, 620–628.
- Haswell, E.S., Phillips, R., and Rees, D.C. (2011). Mechanosensitive channels: what can they do and how do they do it? *Struct. Lond. Engl.* *19*, 1356–1369.
- He, C., Zhang, H., Mirshahi, T., and Logothetis, D.E. (1999). Identification of a potassium channel site that interacts with G protein betagamma subunits to mediate agonist-induced signaling. *J. Biol. Chem.* *274*, 12517–12524.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K⁺ channel signature sequence. *Biophys. J.* *66*, 1061–1067.

- Heitzmann, D., Derand, R., Jungbauer, S., Bandulik, S., Sterner, C., Schweda, F., El Wakil, A., Lalli, E., Guy, N., Mengual, R., et al. (2008). Invalidation of TASK1 potassium channels disrupts adrenal gland zonation and mineralocorticoid homeostasis. *EMBO J.* *27*, 179–187.
- Henry, P., Pearson, W.L., and Nichols, C.G. (1996). Protein kinase C inhibition of cloned inward rectifier (HRK1/KIR2.3) K⁺ channels expressed in *Xenopus* oocytes. *J. Physiol.* *495* (Pt 3), 681–688.
- Hervieu, G.J., Cluderay, J.E., Gray, C.W., Green, P.J., Ranson, J.L., Randall, A.D., and Meadows, H.J. (2001). Distribution and expression of TREK-1, a two-pore-domain potassium channel, in the adult rat CNS. *Neuroscience* *103*, 899–919.
- Heurteaux, C., Guy, N., Laigle, C., Blondeau, N., Duprat, F., Mazzuca, M., Lang-Lazdunski, L., Widmann, C., Zanzouri, M., Romey, G., et al. (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *EMBO J.* *23*, 2684–2695.
- Heurteaux, C., Lucas, G., Guy, N., El Yacoubi, M., Thümmler, S., Peng, X.-D., Noble, F., Blondeau, N., Widmann, C., Borsotto, M., et al. (2006). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nat. Neurosci.* *9*, 1134–1141.
- Hibino, H., Nin, F., Tsuzuki, C., and Kurachi, Y. (2009). How is the highly positive endocochlear potential formed? The specific architecture of the stria vascularis and the roles of the ion-transport apparatus. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* *459*, 521–533.
- Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* *90*, 291–366.
- Ho, I.H.M., and Murrell-Lagnado, R.D. (1999). Molecular mechanism for sodium-dependent activation of G protein-gated K⁺ channels. *J. Physiol.* *520*, 645–651.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952a). Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* *116*, 449–472.
- Hodgkin, A.L., and Huxley, A.F. (1952b). A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* *117*, 500–544.
- Hoffman, J.F., Joiner, W., Nehrke, K., Potapova, O., Foye, K., and Wickrema, A. (2003). The hSK4 (KCNN4) isoform is the Ca²⁺-activated K⁺ channel (Gardos channel) in human red blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 7366–7371.
- Honoré, E., Maingret, F., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2002). An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *EMBO J.* *21*, 2968–2976.
- Honoré, E., Patel, A.J., Chemin, J., Suchyna, T., and Sachs, F. (2006). Desensitization of mechano-gated K₂P channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 6859–6864.
- Hsieh, C.-P., Kuo, C.-C., and Huang, C.-W. (2015). Driving force-dependent block by internal Ba²⁺ on the Kir2.1 channel: Mechanistic insight into inward rectification. *Biophys. Chem.* *202*, 40–57.
- Hu, H., and Sachs, F. (1997). Stretch-activated ion channels in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* *29*, 1511–1523.
- Hu, H., Shao, L.R., Chavoshy, S., Gu, N., Trieb, M., Behrens, R., Laake, P., Pongs, O., Knaus, H.G., Ottersen, O.P., et al. (2001). Presynaptic Ca²⁺-activated K⁺ channels in glutamatergic hippocampal terminals and their role in spike repolarization and regulation of transmitter release. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 9585–9597.
- Huang, C.L., Feng, S., and Hilgemann, D.W. (1998). Direct activation of inward rectifier potassium channels by PIP₂ and its stabilization by Gbetagamma. *Nature* *391*, 803–806.

- Huang, D.-Y., Yu, B.-W., and Fan, Q.-W. (2008). Roles of TRESK, a novel two-pore domain K⁺ channel, in pain pathway and general anesthesia. *Neurosci. Bull.* *24*, 166–172.
- Hughes, B.A., and Swaminathan, A. (2008). Modulation of the Kir7.1 potassium channel by extracellular and intracellular pH. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *294*, C423–431.
- Hwang, E.M., Kim, E., Yarishkin, O., Woo, D.H., Han, K.-S., Park, N., Bae, Y., Woo, J., Kim, D., Park, M., et al. (2014). A disulphide-linked heterodimer of TWIK-1 and TREK-1 mediates passive conductance in astrocytes. *Nat. Commun.* *5*, 3227.
- Inglis, S.K., Brown, S.G., Constable, M.J., McTavish, N., Olver, R.E., and Wilson, S.M. (2007). A Ba²⁺-resistant, acid-sensitive K⁺ conductance in Na⁺-absorbing H441 human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *292*, L1304–L1312.
- Innamaa, A., Jackson, L., Asher, V., Schalkwyk, G. van, Warren, A., Keightley, A., Hay, D., Bali, A., Sowter, H., and Khan, R. (2013). Expression and effects of modulation of the K2P potassium channels TREK-1 (KCNK2) and TREK-2 (KCNK10) in the normal human ovary and epithelial ovarian cancer. *Clin. Transl. Oncol.* *15*, 910–918.
- Iwanir, S., and Reuveny, E. (2008). Adrenaline-induced hyperpolarization of mouse pancreatic islet cells is mediated by G protein-gated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* *456*, 1097–1108.
- Jain, A., Liu, R., Ramani, B., Arauz, E., Ishitsuka, Y., Ragunathan, K., Park, J., Chen, J., Xiang, Y.K., and Ha, T. (2011). Probing Cellular Protein Complexes via Single Molecule Pull-down. *Nature* *473*, 484–488.
- Jang, J.-H., Lee, C.S., Hwang, D., and Ryu, S.H. (2012). Understanding of the roles of phospholipase D and phosphatidic acid through their binding partners. *Prog. Lipid Res.* *51*, 71–81.
- Julius, D., and Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* *413*, 203–210.
- Kalman, K., Pennington, M.W., Lanigan, M.D., Nguyen, A., Rauer, H., Mahnir, V., Paschetto, K., Kem, W.R., Grissmer, S., Gutman, G.A., et al. (1998). ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J. Biol. Chem.* *273*, 32697–32707.
- Kambayashi, Y., Bardhan, S., Takahashi, K., Tsuzuki, S., Inui, H., Hamakubo, T., and Inagami, T. (1993). Molecular cloning of a novel angiotensin II receptor isoform involved in phosphotyrosine phosphatase inhibition. *J. Biol. Chem.* *268*, 24543–24546.
- Kang, D., and Kim, D. (2004). Single-channel properties and pH sensitivity of two-pore domain K⁺ channels of the TALK family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *315*, 836–844.
- Kang, D., and Kim, D. (2006). TREK-2 (K2P10.1) and TRESK (K2P18.1) are major background K⁺ channels in dorsal root ganglion neurons. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* *291*, C138–C146.
- Kang, D., Choe, C., and Kim, D. (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *J. Physiol.* *564*, 103–116.
- Karle, C.A., Zitron, E., Zhang, W., Wendt-Nordahl, G., Kathöfer, S., Thomas, D., Gut, B., Scholz, E., Vahl, C.-F., Katus, H.A., et al. (2002). Human cardiac inwardly-rectifying K⁺ channel Kir(2.1b) is inhibited by direct protein kinase C-dependent regulation in human isolated cardiomyocytes and in an expression system. *Circulation* *106*, 1493–1499.
- Karschin, C., Wischmeyer, E., Preisig-Müller, R., Rajan, S., Derst, C., Grzeschik, K.H., Daut, J., and Karschin, A. (2001). Expression pattern in brain of TASK-1, TASK-3, and a tandem pore domain K(+) channel subunit, TASK-5, associated with the central auditory nervous system. *Mol. Cell. Neurosci.* *18*, 632–648.
- Katz, B. (1949). Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* 285–299.

- Kelly, D., Mackenzie, L., Hunter, P., Smaill, B., and Saint, D.A. (2006). Gene expression of stretch-activated channels and mechanoelectric feedback in the heart. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* *33*, 642–648.
- Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995). A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem. *Nature* *376*, 690–695.
- Kim, D. (1992). A mechanosensitive K⁺ channel in heart cells. Activation by arachidonic acid. *J. Gen. Physiol.* *100*, 1021–1040.
- Kim, D., and Gnatenco, C. (2001). TASK-5, a New Member of the Tandem-Pore K⁺ Channel Family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *284*, 923–930.
- Kim, D., Cavanaugh, E.J., Kim, I., and Carroll, J.L. (2009). Heteromeric TASK-1/TASK-3 is the major oxygen-sensitive background K⁺ channel in rat carotid body glomus cells. *J. Physiol.* *587*, 2963–2975.
- Kim, E., Hwang, E.M., Yarishkin, O., Yoo, J.C., Kim, D., Park, N., Cho, M., Lee, Y.S., Sun, C.-H., Yi, G.-S., et al. (2010). Enhancement of TREK1 channel surface expression by protein-protein interaction with beta-COP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *395*, 244–250.
- Kim, Y., Bang, H., and Kim, D. (1999). TBAK-1 and TASK-1, two-pore K(+) channel subunits: kinetic properties and expression in rat heart. *Am. J. Physiol.* *277*, H1669-1678.
- Kim, Y., Gnatenco, C., Bang, H., and Kim, D. (2001a). Localization of TREK-2 K⁺ channel domains that regulate channel kinetics and sensitivity to pressure, fatty acids and pHi. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *442*, 952–960.
- Kim, Y., Bang, H., Gnatenco, C., and Kim, D. (2001b). Synergistic interaction and the role of C-terminus in the activation of TRAAK K⁺ channels by pressure, free fatty acids and alkali. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *442*, 64–72.
- Kindler, C.H., Paul, M., Zou, H., Liu, C., Winegar, B.D., Gray, A.T., and Yost, C.S. (2003). Amide local anesthetics potently inhibit the human tandem pore domain background K⁺ channel TASK-2 (KCNK5). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *306*, 84–92.
- Klein, J. (2005). Functions and pathophysiological roles of phospholipase D in the brain. *J. Neurochem.* *94*, 1473–1487.
- Klein, M., and Kandel, E.R. (1980). Mechanism of calcium current modulation underlying presynaptic facilitation and behavioral sensitization in Aplysia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *77*, 6912–6916.
- Klein, M., Shapiro, E., and Kandel, E.R. (1980). Synaptic Plasticity and the Modulation of the Ca²⁺ Current. *J. Exp. Biol.* *89*, 117–157.
- Koyrakh, L., Luján, R., Colón, J., Karschin, C., Kurachi, Y., Karschin, A., and Wickman, K. (2005). Molecular and cellular diversity of neuronal G-protein-gated potassium channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 11468–11478.
- Kramer, J.W., Post, M.A., Brown, A.M., and Kirsch, G.E. (1998). Modulation of potassium channel gating by coexpression of Kv2.1 with regulatory Kv5.1 or Kv6.1 alpha-subunits. *Am. J. Physiol.* *274*, C1501-1510.
- Krapivinsky, G., Krapivinsky, L., Wickman, K., and Clapham, D.E. (1995). Gβγ Binds Directly to the G Protein-gated K⁺ Channel, IKACH. *J. Biol. Chem.* *270*, 29059–29062.
- Kung, C. (2005). A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature* *436*, 647–654.
- Laflamme, L., Gasparo, M. de, Gallo, J.-M., Payet, M.D., and Gallo-Payet, N. (1996). Angiotensin II Induction of Neurite Outgrowth by AT₂ Receptors in NG108-15 Cells EFFECT COUNTERACTED BY THE AT₁ RECEPTORS. *J. Biol. Chem.* *271*, 22729–22735.

- Lafrenière, R.G., Cader, M.Z., Poulin, J.-F., Andres-Enguix, I., Simoneau, M., Gupta, N., Boisvert, K., Lafrenière, F., McLaughlan, S., Dubé, M.-P., et al. (2010). A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat. Med.* *16*, 1157–1160.
- Laigle, C., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Cozzone, P.J., and Viola, A. (2012). Deletion of TRAAK Potassium Channel Affects Brain Metabolism and Protects against Ischemia. *PLoS ONE* *7*.
- Lauritzen, I., Zanzouri, M., Honoré, E., Duprat, F., Ehrenguber, M.U., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2003). K⁺-dependent Cerebellar Granule Neuron Apoptosis ROLE OF TASK LEAK K⁺ CHANNELS. *J. Biol. Chem.* *278*, 32068–32076.
- Lauritzen, I., Chemin, J., Honoré, E., Jodar, M., Guy, N., Lazdunski, M., and Jane Patel, A. (2005). Cross-talk between the mechano-gated K₂P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO Rep.* *6*, 642–648.
- Lee, N.M., Carter, A., Owen, N., and Hall, W.D. (2012). The neurobiology of overeating. Treating overweight individuals should make use of neuroscience research, but not at the expense of population approaches to diet and lifestyle. *EMBO Rep.* *13*, 785–790.
- Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Duprat, F., Lazdunski, M., Romey, G., and Barhanin, J. (1996a). TWIK-1, a ubiquitous human weakly inward rectifying K⁺ channel with a novel structure. *EMBO J.* *15*, 1004–1011.
- Lesage, F., Reyes, R., Fink, M., Duprat, F., Guillemare, E., and Lazdunski, M. (1996b). Dimerization of TWIK-1 K⁺ channel subunits via a disulfide bridge. *EMBO J.* *15*, 6400–6407.
- Lesage, F., Maingret, F., and Lazdunski, M. (2000a). Cloning and expression of human TRAAK, a polyunsaturated fatty acids-activated and mechano-sensitive K(+) channel. *FEBS Lett.* *471*, 137–140.
- Lesage, F., Terrenoire, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000b). Human TREK2, a 2P domain mechano-sensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem.* *275*, 28398–28405.
- L'Hoste, S., Poet, M., Durantou, C., Belfodil, R., é Barriere, H., Rubera, I., Tauc, M., Poujeol, C., Barhanin, J., and Poujeol, P. (2007). Role of TASK2 in the control of apoptotic volume decrease in proximal kidney cells. *J. Biol. Chem.* *282*, 36692–36703.
- Li, X.-Y., and Toyoda, H. (2015). Role of leak potassium channels in pain signaling. *Brain Res. Bull.* *119, Part A*, 73–79.
- Linden, A.-M., Aller, M.I., Leppä, E., Vekovischeva, O., Aitta-Aho, T., Veale, E.L., Mathie, A., Rosenberg, P., Wisden, W., and Korpi, E.R. (2006). The in vivo contributions of TASK-1-containing channels to the actions of inhalation anesthetics, the alpha(2) adrenergic sedative dexmedetomidine, and cannabinoid agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *317*, 615–626.
- Liou, Y.-J., Chen, T.-J., Tsai, S.-J., Yu, Y.W.-Y., Cheng, C.-Y., and Hong, C.-J. (2009). Support for the involvement of the KCNK2 gene in major depressive disorder and response to antidepressant treatment. *Pharmacogenet. Genomics* *19*, 735–741.
- Lopatin, A.N., Makhina, E.N., and Nichols, C.G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* *372*, 366–369.
- Lopes, C.M.B., Rohács, T., Czirják, G., Balla, T., Enyedi, P., and Logothetis, D.E. (2005). PIP₂ hydrolysis underlies agonist-induced inhibition and regulates voltage gating of two-pore domain K⁺ channels. *J. Physiol.* *564*, 117–129.
- Lotshaw, D.P. (2006). Biophysical and pharmacological characteristics of native two-pore domain TASK channels in rat adrenal glomerulosa cells. *J. Membr. Biol.* *210*, 51–70.

- Lu, Z. (2004). Mechanism of rectification in inward-rectifier K⁺ channels. *Annu. Rev. Physiol.* *66*, 103–129.
- Lüscher, C., Jan, L.Y., Stoffel, M., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1997). G Protein-Coupled Inwardly Rectifying K⁺ Channels (GIRKs) Mediate Postsynaptic but Not Presynaptic Transmitter Actions in Hippocampal Neurons. *Neuron* *19*, 687–695.
- Ma, L., Zhang, X., and Chen, H. (2011). TWIK-1 two-pore domain potassium channels change ion selectivity and conduct inward leak sodium currents in hypokalemia. *Sci. Signal.* *4*, ra37.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (1999a). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J. Biol. Chem.* *274*, 26691–26696.
- Maingret, F., Fosset, M., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (1999b). TRAAK is a mammalian neuronal mechano-gated K⁺ channel. *J. Biol. Chem.* *274*, 1381–1387.
- Maingret, F., Lauritzen, I., Patel, A.J., Heurteaux, C., Reyes, R., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000a). TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *EMBO J.* *19*, 2483–2491.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lesage, F., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000b). Lysophospholipids open the two-pore domain mechano-gated K(+) channels TREK-1 and TRAAK. *J. Biol. Chem.* *275*, 10128–10133.
- Maingret, F., Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2001). The endocannabinoid anandamide is a direct and selective blocker of the background K(+) channel TASK-1. *EMBO J.* *20*, 47–54.
- Maingret, F., Honoré, E., Lazdunski, M., and Patel, A.J. (2002). Molecular basis of the voltage-dependent gating of TREK-1, a mechano-sensitive K(+) channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *292*, 339–346.
- Maljevic, S., Wuttke, T.V., Seebohm, G., and Lerche, H. (2010). KV7 channelopathies. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *460*, 277–288.
- Marsh, B., Acosta, C., Djouhri, L., and Lawson, S.N. (2012). Leak K⁺ channel mRNAs in dorsal root ganglia: relation to inflammation and spontaneous pain behaviour. *Mol. Cell. Neurosci.* *49*, 375–386.
- Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Korduláková, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., Aubry, J., Milon, G., Legras, P., André, J.-P.S., et al. (2007). Impact of Mycobacterium ulcerans Biofilm on Transmissibility to Ecological Niches and Buruli Ulcer Pathogenesis. *PLOS Pathog* *3*, e62.
- Matavelli, L.C., and Siragy, H.M. (2015). AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* *65*, 226–232.
- Maylie, J., Bond, C.T., Herson, P.S., Lee, W.-S., and Adelman, J.P. (2004). Small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and calmodulin. *J. Physiol.* *554*, 255–261.
- Mazella, J., Pétrault, O., Lucas, G., Deval, E., Béraud-Dufour, S., Gandin, C., El-Yacoubi, M., Widmann, C., Guyon, A., Chevet, E., et al. (2010). Spadin, a sortilin-derived peptide, targeting rodent TREK-1 channels: a new concept in the antidepressant drug design. *PLoS Biol.* *8*, e1000355.
- McCarthy, T. (2014). Development of EMA401 as an orally-administered, highly-selective angiotensin II type 2 receptor antagonist for the treatment of neuropathic pain. *J. Peripher. Nerv. Syst. JPNS* *19 Suppl 2*, S13-14.
- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kellsell, R.E., Gloger, I.I., and Pangalos, M.N. (2001a). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Mol. Brain Res.* *86*, 101–114.

- Medhurst, A.D., Rennie, G., Chapman, C.G., Meadows, H., Duckworth, M.D., Kellsell, R.E., Gloger, I.I., and Pangalos, M.N. (2001b). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *86*, 101–114.
- Meera, P., Wallner, M., Song, M., and Toro, L. (1997). Large conductance voltage- and calcium-dependent K⁺ channel, a distinct member of voltage-dependent ion channels with seven N-terminal transmembrane segments (S0-S6), an extracellular N terminus, and an intracellular (S9-S10) C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 14066–14071.
- Millar, J.A., Barratt, L., Southan, A.P., Page, K.M., Fyffe, R.E., Robertson, B., and Mathie, A. (2000). A functional role for the two-pore domain potassium channel TASK-1 in cerebellar granule neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 3614–3618.
- Miller, A.N., and Long, S.B. (2012). Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. *Science* *335*, 432–436.
- Morais-Cabral, J.H., Zhou, Y., and MacKinnon, R. (2001). Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* *414*, 37–42.
- Morenilla-Palao, C., Luis, E., Fernández-Peña, C., Quintero, E., Weaver, J.L., Bayliss, D.A., and Viana, F. (2014). Ion channel profile of TRPM8 cold receptors reveals a role of TASK-3 potassium channels in thermosensation. *Cell Rep.* *8*, 1571–1582.
- Morton, M.J., O’Connell, A.D., Sivaprasadarao, A., and Hunter, M. (2003). Determinants of pH sensing in the two-pore domain K(+) channels TASK-1 and -2. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *445*, 577–583.
- Morton, M.J., Chipperfield, S., Abohamed, A., Sivaprasadarao, A., and Hunter, M. (2005). Na(+)-induced inward rectification in the two-pore domain K(+) channel, TASK-2. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* *288*, F162-169.
- Mulatero, P., Tauber, P., Zennaro, M.-C., Monticone, S., Lang, K., Beuschlein, F., Fischer, E., Tizzani, D., Pallauf, A., Viola, A., et al. (2012). KCNJ5 mutations in European families with nonglucocorticoid remediable familial hyperaldosteronism. *Hypertens. Dallas Tex 1979* *59*, 235–240.
- Müllner, C., Vorobiov, D., Bera, A.K., Uezono, Y., Yakubovich, D., Frohnwieser-Steinecker, B., Dascal, N., and Schreibleyner, W. (2000). Heterologous facilitation of G protein-activated K(+) channels by beta-adrenergic stimulation via cAMP-dependent protein kinase. *J. Gen. Physiol.* *115*, 547–558.
- Murbartián, J., Lei, Q., Sando, J.J., and Bayliss, D.A. (2005). Sequential phosphorylation mediates receptor- and kinase-induced inhibition of TREK-1 background potassium channels. *J. Biol. Chem.* *280*, 30175–30184.
- Namsolleck, P., Recarti, C., Foulquier, S., Steckelings, U.M., and Unger, T. (2014). AT2 Receptor and Tissue Injury: Therapeutic Implications. *Curr. Hypertens. Rep.* *16*.
- Nanjundan, M., and Possmayer, F. (2003). Pulmonary phosphatidic acid phosphatase and lipid phosphate phosphohydrolase. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* *284*, L1-23.
- Nayak, T.K., Harinath, S., Nama, S., Somasundaram, K., and Sikdar, S.K. (2009). Inhibition of human two-pore domain K⁺ channel TREK1 by local anesthetic lidocaine: negative cooperativity and half-of-sites saturation kinetics. *Mol. Pharmacol.* *76*, 903–917.
- Newberry, N.R., and Nicoll, R.A. (1984). Direct hyperpolarizing action of baclofen on hippocampal pyramidal cells. *Nature* *308*, 450–452.
- Neyton, J., and Miller, C. (1988). Discrete Ba²⁺ block as a probe of ion occupancy and pore structure in the high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* *92*, 569–586.
- Nichols, C.G., and Lederer, W.J. (1991). Adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in the cardiovascular system. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* *261*, H1675–H1686.

- Nicolas, M.T., Barhanin, J., Reyes, R., and Demêmes, D. (2003). Cellular localization of TWIK-1, a two-pore-domain potassium channel in the rodent inner ear. *Hear. Res.* *181*, 20–26.
- Nie, X., Arrighi, I., Kaissling, B., Pfaff, I., Mann, J., Barhanin, J., and Vallon, V. (2005). Expression and insights on function of potassium channel TWIK-1 in mouse kidney. *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.* *451*, 479–488.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Barros, L.F., and Sepúlveda, F.V. (2001). Modulation of the two-pore domain acid-sensitive K⁺ channel TASK-2 (KCNK5) by changes in cell volume. *J. Biol. Chem.* *276*, 43166–43174.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Valenzuela, X., Paeile, V., and Sepúlveda, F.V. (2003). Extracellular conserved cysteine forms an intersubunit disulphide bridge in the KCNK5 (TASK-2) K⁺ channel without having an essential effect upon activity. *Mol. Membr. Biol.* *20*, 185–191.
- Niemeyer, M.I., González-Nilo, F.D., Zúñiga, L., González, W., Cid, L.P., and Sepúlveda, F.V. (2007). Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K⁺ channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 666–671.
- Niemeyer, M.I., Cid, L.P., Peña-Münzenmayer, G., and Sepúlveda, F.V. (2010). Separate gating mechanisms mediate the regulation of K2P potassium channel TASK-2 by intra- and extracellular pH. *J. Biol. Chem.* *285*, 16467–16475.
- Nishi, H., Hashimoto, K., Madej, T., and Panchenko, A.R. (2013). Evolutionary, Physicochemical, and Functional Mechanisms of Protein Homooligomerization. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* *117*, 3–24.
- Noël, J., Zimmermann, K., Busserolles, J., Deval, E., Alloui, A., Diochot, S., Guy, N., Borsotto, M., Reeh, P., Eschalier, A., et al. (2009). The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* *28*, 1308–1318.
- Noël, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels* *5*, 402–409.
- O’Kelly, I., and Goldstein, S.A.N. (2008). Forward Transport of K2p3.1: mediation by 14-3-3 and COPI, modulation by p11. *Traffic Cph. Den.* *9*, 72–78.
- O’Kelly, I., Butler, M.H., Zilberberg, N., and Goldstein, S.A.N. (2002). Forward transport. 14-3-3 binding overcomes retention in endoplasmic reticulum by dibasic signals. *Cell* *111*, 577–588.
- Omodeo-Salé, F., Lindi, C., Palestini, P., and Masserini, M. (1991). Role of phosphatidylethanol in membranes. Effects on membrane fluidity, tolerance to ethanol, and activity of membrane-bound enzymes. *Biochemistry (Mosc.)* *30*, 2477–2482.
- Ozaita, A., and Vega-Saenz de Miera, E. (2002). Cloning of two transcripts, HKT4.1a and HKT4.1b, from the human two-pore K⁺ channel gene KCNK4. Chromosomal localization, tissue distribution and functional expression. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *102*, 18–27.
- Pandit, L.M., Lloyd, E.E., Reynolds, J.O., Lawrence, W.S., Reynolds, C., Wehrens, X.H.T., and Bryan, R.M. (2014). TWIK-2 channel deficiency leads to pulmonary hypertension through a Rho-kinase mediated process. *Hypertension* *64*, 1260–1265.
- Park, K.-S., Han, M.H., Jang, H.K., Kim, K.-A., Cha, E.-J., Kim, W.-J., Choi, Y.H., and Kim, Y. (2013). The TREK2 Channel Is Involved in the Proliferation of 253J Cell, a Human Bladder Carcinoma Cell. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.* *17*, 511–516.
- Patel, A.J., Honoré, E., Maingret, F., Lesage, F., Fink, M., Duprat, F., and Lazdunski, M. (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *EMBO J.* *17*, 4283–4290.
- Patel, A.J., Honoré, E., Lesage, F., Fink, M., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nat. Neurosci.* *2*, 422–426.

- Patel, A.J., Maingret, F., Magnone, V., Fosset, M., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2000). TWIK-2, an Inactivating 2P Domain K⁺ Channel. *J. Biol. Chem.* *275*, 28722–28730.
- Patel, A.J., Lazdunski, M., and Honoré, E. (2001). Lipid and mechano-gated 2P domain K⁽⁺⁾ channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 422–428.
- Pereira, V., Busserolles, J., Christin, M., Devilliers, M., Poupon, L., Legha, W., Alloui, A., Aissouni, Y., Bourinet, E., Lesage, F., et al. (2014). Role of the TREK2 potassium channel in cold and warm thermosensation and in pain perception. *Pain* *155*, 2534–2544.
- Perlis, R.H., Moorjani, P., Fagerness, J., Purcell, S., Trivedi, M.H., Fava, M., Rush, A.J., and Smoller, J.W. (2008). Pharmacogenetic analysis of genes implicated in rodent models of antidepressant response: association of TREK1 and treatment resistance in the STAR(*)D study. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* *33*, 2810–2819.
- Phillips, R., Ursell, T., Wiggins, P., and Sens, P. (2009). Emerging roles for lipids in shaping membrane-protein function. *Nature* *459*, 379–385.
- Piechotta, P.L., Rapedius, M., Stansfeld, P.J., Bollepalli, M.K., Erlich, G., Andres-Enguix, I., Fritzenschaft, H., Decher, N., Sansom, M.S.P., Tucker, S.J., et al. (2011). The pore structure and gating mechanism of K2P channels. *EMBO J.* *30*, 3607–3619.
- Pinard, A., Seddik, R., and Bettler, B. (2010). GABAB Receptors: Physiological Functions and Mechanisms of Diversity. In *Advances in Pharmacology*, T.P. Blackburn, ed. (Academic Press), pp. 231–255.
- Plant, L.D., Zuniga, L., Araki, D., Marks, J.D., and Goldstein, S.A.N. (2012). SUMOylation Silences Heterodimeric TASK Potassium Channels Containing K2P1 Subunits in Cerebellar Granule Neurons. *Sci Signal* *5*, ra84-ra84.
- Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., et al. (2001). Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* *105*, 511–519.
- Pollema-Mays, S.L., Centeno, M.V., Ashford, C.J., Apkarian, A.V., and Martina, M. (2013). Expression of background potassium channels in rat DRG is cell-specific and down-regulated in a neuropathic pain model. *Mol. Cell. Neurosci.* *57*, 1–9.
- Preisig-Müller, R., Schlichthörl, G., Goerge, T., Heinen, S., Brüggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R.W., and Daut, J. (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen's syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 7774–7779.
- Punke, M.A., Licher, T., Pongs, O., and Friederich, P. (2003). Inhibition of human TREK-1 channels by bupivacaine. *Anesth. Analg.* *96*, 1665–1673, table of contents.
- Qu, Z., Yang, Z., Cui, N., Zhu, G., Liu, C., Xu, H., Chanchevalap, S., Shen, W., Wu, J., Li, Y., et al. (2000). Gating of inward rectifier K⁺ channels by proton-mediated interactions of N- and C-terminal domains. *J. Biol. Chem.* *275*, 31573–31580.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Xin Liu, G., Preisig-Müller, R., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2000). TASK-3, a novel tandem pore domain acid-sensitive K⁺ channel. An extracellular histidine as pH sensor. *J. Biol. Chem.* *275*, 16650–16657.
- Rajan, S., Wischmeyer, E., Karschin, C., Preisig-Müller, R., Grzeschik, K.H., Daut, J., Karschin, A., and Derst, C. (2001). THIK-1 and THIK-2, a novel subfamily of tandem pore domain K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* *276*, 7302–7311.
- Rajan, S., Preisig-Müller, R., Wischmeyer, E., Nehring, R., Hanley, P.J., Renigunta, V., Musset, B., Schlichthörl, G., Derst, C., Karschin, A., et al. (2002). Interaction with 14-3-3 proteins promotes functional expression of the potassium channels TASK-1 and TASK-3. *J. Physiol.* *545*, 13–26.

- Rajan, S., Plant, L.D., Rabin, M.L., Butler, M.H., and Goldstein, S.A.N. (2005). Sumoylation silences the plasma membrane leak K⁺ channel K2P1. *Cell* 121, 37–47.
- Rapedius, M., Schmidt, M.R., Sharma, C., Stansfeld, P.J., Sansom, M.S.P., Baukrowitz, T., and Tucker, S.J. (2012). State-independent intracellular access of quaternary ammonium blockers to the pore of TREK-1. *Channels Austin Tex* 6, 473–478.
- Rawicz, W., Olbrich, K.C., McIntosh, T., Needham, D., and Evans, E. (2000). Effect of chain length and unsaturation on elasticity of lipid bilayers. *Biophys. J.* 79, 328–339.
- Renigunta, V., Schlichthörl, G., and Daut, J. (2015). Much more than a leak: structure and function of K₂p-channels. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* 467, 867–894.
- Rice, A.S.C., Dworkin, R.H., McCarthy, T.D., Anand, P., Bountra, C., McCloud, P.I., Hill, J., Cutter, G., Kitson, G., Desem, N., et al. (2014). EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *The Lancet* 383, 1637–1647.
- Robitaille, R., and Charlton, M.P. (1992). Presynaptic calcium signals and transmitter release are modulated by calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 12, 297–305.
- Ruskoaho, H. (1992). Atrial natriuretic peptide: synthesis, release, and metabolism. *Pharmacol. Rev.* 44, 479–602.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J.P., and Lazdunski, M. (1997). New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 272, 24371–24379.
- Salinas, M., Reyes, R., Lesage, F., Fosset, M., Heurteaux, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (1999). Cloning of a new mouse two-P domain channel subunit and a human homologue with a unique pore structure. *J. Biol. Chem.* 274, 11751–11760.
- Salkoff, L. [b1 b2] (analytic), Butler, A. [b1] (analytic), Ferreira, C. [b3] (analytic), Santi, C. [b1] (analytic), and Wei, A. [b1] (analytic) (2006). High-conductance potassium channels of the SLO family (English). *Nat Rev Neurosci Print* 7, 921–931.
- Sandoz, G., and Lesage, F. (2008). Protein complex analysis of native brain potassium channels by proteomics. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 491, 113–123.
- Sandoz, G., and Levitz, J. (2013). Optogenetic techniques for the study of native potassium channels. *Front. Mol. Neurosci.* 6, 6.
- Sandoz, G., Thümmeler, S., Duprat, F., Feliciangeli, S., Vinh, J., Escoubas, P., Guy, N., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2006). AKAP150, a switch to convert mechano-, pH- and arachidonic acid-sensitive TREK K(+) channels into open leak channels. *EMBO J.* 25, 5864–5872.
- Sandoz, G., Tardy, M.P., Thümmeler, S., Feliciangeli, S., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2008). Mtap2 is a constituent of the protein network that regulates twik-related K⁺ channel expression and trafficking. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 8545–8552.
- Sandoz, G., Douguet, D., Chatelain, F., Lazdunski, M., and Lesage, F. (2009). Extracellular acidification exerts opposite actions on TREK1 and TREK2 potassium channels via a single conserved histidine residue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 14628–14633.
- Sandoz, G., Bell, S.C., and Isacoff, E.Y. (2011). Optical probing of a dynamic membrane interaction that regulates the TREK1 channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 2605–2610.
- Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., and Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling. *Neuron* 74, 1005–1014.

- Sano, Y., Inamura, K., Miyake, A., Mochizuki, S., Kitada, C., Yokoi, H., Nozawa, K., Okada, H., Matsushime, H., and Furuichi, K. (2003). A novel two-pore domain K⁺ channel, TRESK, is localized in the spinal cord. *J. Biol. Chem.* *278*, 27406–27412.
- Saransaari, P., and Oja, S.S. (2000). Taurine and neural cell damage. *Amino Acids* *19*, 509–526.
- Schaffer, S., Takahashi, K., and Azuma, J. (2000). Role of osmoregulation in the actions of taurine. *Amino Acids* *19*, 527–546.
- Scheffer, H., Brunt, E.R., Mol, G.J., van der Vlies, P., Stulp, R.P., Verlind, E., Mantel, G., Averyanov, Y.N., Hofstra, R.M., and Buys, C.H. (1998). Three novel KCNA1 mutations in episodic ataxia type I families. *Hum. Genet.* *102*, 464–466.
- Schneider, E.R., Anderson, E.O., Gracheva, E.O., and Bagriantsev, S.N. (2014). Temperature sensitivity of two-pore (K2P) potassium channels. *Curr. Top. Membr.* *74*, 113–133.
- Schram, G., Melnyk, P., Pourrier, M., Wang, Z., and Nattel, S. (2002). Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J. Physiol.* *544*, 337–349.
- Schreiber, M., Wei, A., Yuan, A., Gaut, J., Saito, M., and Salkoff, L. (1998). Slo3, a novel pH-sensitive K⁺ channel from mammalian spermatocytes. *J. Biol. Chem.* *273*, 3509–3516.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kümmerlen, R., Hinnah, S., Müller, D., Betzler, M., Steinkamp, T., and Wagner, R. (1995). A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J.* *14*, 5170–5178.
- Schulte, U., Hahn, H., Konrad, M., Jeck, N., Derst, C., Wild, K., Weidemann, S., Ruppertsberg, J.P., Fakler, B., and Ludwig, J. (1999). pH gating of ROMK (K(ir)1.1) channels: control by an Arg-Lys-Arg triad disrupted in antenatal Bartter syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 15298–15303.
- Schulze-Bahr, E., Wang, Q., Wedekind, H., Haverkamp, W., Chen, Q., Sun, Y., Ruble, C., Hördt, M., Towbin, J.A., Borggrefe, M., et al. (1997). KCNE1 mutations cause Jervell and Lange-Nielsen syndrome. *Nat. Genet.* *17*, 267–268.
- Selvy, P.E., Lavieri, R.R., Lindsley, C.W., and Brown, H.A. (2011). Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation. *Chem. Rev.* *111*, 6064–6119.
- Seoh, S.A., Sigg, D., Papazian, D.M., and Bezanilla, F. (1996). Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* *16*, 1159–1167.
- Shealy, R.T., Murphy, A.D., Ramarathnam, R., Jakobsson, E., and Subramaniam, S. (2003). Sequence-Function Analysis of the K⁺-Selective Family of Ion Channels Using a Comprehensive Alignment and the KcsA Channel Structure. *Biophys. J.* *84*, 2929–2942.
- Shoeb, F., Malykhina, A.P., and Akbarali, H.I. (2003). Cloning and functional characterization of the smooth muscle ether-a-go-go-related gene K⁺ channel. Potential role of a conserved amino acid substitution in the S4 region. *J. Biol. Chem.* *278*, 2503–2514.
- Simkin, D., Cavanaugh, E.J., and Kim, D. (2008). Control of the single channel conductance of K2P10.1 (TREK-2) by the amino-terminus: role of alternative translation initiation. *J. Physiol.* *586*, 5651–5663.
- Soejima, M., and Noma, A. (1984). Mode of regulation of the ACh-sensitive K-channel by the muscarinic receptor in rabbit atrial cells. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *400*, 424–431.
- Splawski, I., Timothy, K.W., Vincent, G.M., Atkinson, D.L., and Keating, M.T. (1997). Molecular Basis of the Long-QT Syndrome Associated with Deafness. *N. Engl. J. Med.* *336*, 1562–1567.
- Splawski, I., Shen, J., Timothy, K.W., Lehmann, M.H., Priori, S., Robinson, J.L., Moss, A.J., Schwartz, P.J., Towbin, J.A., Vincent, G.M., et al. (2000). Spectrum of mutations in long-QT syndrome genes. KVLQT1, HERG, SCN5A, KCNE1, and KCNE2. *Circulation* *102*, 1178–1185.

- Steckelings, U.M., Rompe, F., Kaschina, E., Namsolleck, P., Grzesiak, A., Funke-Kaiser, H., Bader, M., and Unger, T. (2010). The past, present and future of angiotensin II type 2 receptor stimulation. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* *11*, 67–73.
- Su, Z., Anishkin, A., Kung, C., and Saimi, Y. (2011). The core domain as the force sensor of the yeast mechanosensitive TRP channel. *J. Gen. Physiol.* *138*, 627–640.
- Sung, J.Y., Lee, S.Y., Min, D.S., Eom, T.Y., Ahn, Y.S., Choi, M.U., Kwon, Y.K., and Chung, K.C. (2001). Differential activation of phospholipases by mitogenic EGF and neurogenic PDGF in immortalized hippocampal stem cell lines. *J. Neurochem.* *78*, 1044–1053.
- Talley, E.M., Solorzano, G., Lei, Q., Kim, D., and Bayliss, D.A. (2001). Cns distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 7491–7505.
- Tan, J.H.C., Liu, W., and Saint, D.A. (2004). Differential expression of the mechanosensitive potassium channel TREK-1 in epicardial and endocardial myocytes in rat ventricle. *Exp. Physiol.* *89*, 237–242.
- Tang, Q.-Y., Zhang, Z., Xia, X.-M., and Lingle, C.J. (2010). Block of mouse Slo1 and Slo3 K⁺ channels by CTX, IbTX, TEA, 4-AP and quinidine. *Channels Austin Tex* *4*, 22–41.
- Taylor, M.S., Bonev, A.D., Gross, T.P., Eckman, D.M., Brayden, J.E., Bond, C.T., Adelman, J.P., and Nelson, M.T. (2003). Altered expression of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (SK3) channels modulates arterial tone and blood pressure. *Circ. Res.* *93*, 124–131.
- Terrenoire, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2001a). A TREK-1-Like Potassium Channel in Atrial Cells Inhibited by β -Adrenergic Stimulation and Activated by Volatile Anesthetics. *Circ. Res.* *89*, 336–342.
- Terrenoire, C., Lauritzen, I., Lesage, F., Romey, G., and Lazdunski, M. (2001b). A TREK-1-like potassium channel in atrial cells inhibited by beta-adrenergic stimulation and activated by volatile anesthetics. *Circ. Res.* *89*, 336–342.
- Theilig, F., Goranova, I., Hirsch, J.R., Wieske, M., Unsal, S., Bachmann, S., Veh, R.W., and Derst, C. (2008). Cellular localization of THIK-1 (K(2P)13.1) and THIK-2 (K(2P)12.1) K channels in the mammalian kidney. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* *21*, 63–74.
- Thomas, D., Plant, L.D., Wilkens, C.M., McCrossan, Z.A., and Goldstein, S.A.N. (2008). Alternative translation initiation in rat brain yields K2P2.1 potassium channels permeable to sodium. *Neuron* *58*, 859–870.
- Thümmler, S., Duprat, F., and Lazdunski, M. (2007). Antipsychotics inhibit TREK but not TRAAK channels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *354*, 284–289.
- Tichenor, J.N., Hansen, E.T., and Buxton, I.L.O. (2005). Expression of stretch-activated potassium channels in human myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* *48*, 44–48.
- Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014). Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends Neurosci.* *37*, 146–158.
- Tulleuda, A., Cokic, B., Callejo, G., Saiani, B., Serra, J., and Gasull, X. (2011). TRESK channel contribution to nociceptive sensory neurons excitability: modulation by nerve injury. *Mol. Pain* *7*, 30.
- Ulbrich, M.H., and Isacoff, E.Y. (2007). Subunit counting in membrane-bound proteins. *Nat. Methods* *4*, 319–321.
- Ulbrich, M.H., and Isacoff, E.Y. (2008). Rules of engagement for NMDA receptor subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14163–14168.
- Vaishnavi, A., Sowmya, G., Kalaivanii, J., Ilakya, S., Kanguane, U., and Kanguane, P. (2010). Interaction modes at protein hetero-dimer interfaces. *Bioinformation* *4*, 310–319.

- Veale, E.L., Rees, K.A., Mathie, A., and Trapp, S. (2010). Dominant negative effects of a non-conducting TREK1 splice variant expressed in brain. *J. Biol. Chem.* *285*, 29295–29304.
- Veale, E.L., Al-Moubarak, E., Bajaria, N., Omoto, K., Cao, L., Tucker, S.J., Stevens, E.B., and Mathie, A. (2014). Influence of the N Terminus on the Biophysical Properties and Pharmacology of TREK1 Potassium Channels. *Mol. Pharmacol.* *85*, 671–681.
- Verdonk, K., Danser, A.H.J., and van Esch, J.H.M. (2012). Angiotensin II type 2 receptor agonists: where should they be applied? *Expert Opin. Investig. Drugs* *21*, 501–513.
- Vierra, N.C., Dadi, P.K., Jeong, I., Dickerson, M., Powell, D.R., and Jacobson, D.A. (2015). Type 2 Diabetes-Associated K⁺ Channel TALK-1 Modulates β -Cell Electrical Excitability, Second-Phase Insulin Secretion, and Glucose Homeostasis. *Diabetes* *64*, 3818–3828.
- Vivier, D., Bennis, K., Lesage, F., and Ducki, S. (2016). Perspectives on the Two-Pore Domain Potassium Channel TREK-1 (TWIK-Related K⁺ Channel 1). A Novel Therapeutic Target? *J. Med. Chem.* *59*, 5149–5157.
- Voloshyna, I., Besana, A., Castillo, M., Matos, T., Weinstein, I.B., Mansukhani, M., Robinson, R.B., Cordon-Cardo, C., and Feinmark, S.J. (2008). TREK-1 is a novel molecular target in prostate cancer. *Cancer Res.* *68*, 1197–1203.
- Wan, Y., Wallinder, C., Plouffe, B., Beaudry, H., Mahalingam, A.K., Wu, X., Johansson, B., Holm, M., Botoros, M., Karlén, A., et al. (2004). Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT₂ receptor agonist. *J. Med. Chem.* *47*, 5995–6008.
- Warth, R., Barrière, H., Meneton, P., Bloch, M., Thomas, J., Tauc, M., Heitzmann, D., Romeo, E., Verrey, F., Mengual, R., et al. (2004). Proximal renal tubular acidosis in TASK2 K⁺ channel-deficient mice reveals a mechanism for stabilizing bicarbonate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 8215–8220.
- Waxman, S.G., and Zamponi, G.W. (2014). Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat. Neurosci.* *17*, 153–163.
- Waxman, S.G., Dib-Hajj, S., Cummins, T.R., and Black, J.A. (1999). Sodium channels and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 7635–7639.
- Welch, E.J., Jones, B.W., and Scott, J.D. (2010). Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Mol. Interv.* *10*, 86–97.
- Williams, S., Bateman, A., and O’Kelly, I. (2013). Altered expression of two-pore domain potassium (K₂P) channels in cancer. *PLoS One* *8*, e74589.
- Wood, J.N., Abrahamsen, B., Baker, M.D., Boorman, J.D., Donier, E., Drew, L.J., Nassar, M.A., Okuse, K., Seereeram, A., Stirling, C.L., et al. (2004). Ion channel activities implicated in pathological pain. *Novartis Found. Symp.* *261*, 32-40-54.
- Wu, X., Liang, Y., Zhang, Z., Cao, M., and Liang, W. (2012a). Downregulation of TWIK-related arachidonic acid-activated K⁺ channel in the spinal cord of rats after complete bladder outlet obstruction. *Int. J. Urol. Off. J. Jpn. Urol. Assoc.* *19*, 944–950.
- Wu, Y.-Y., Singer, C.A., and Buxton, I.L.O. (2012b). Variants of Stretch-Activated Two-Pore Potassium Channel TREK-1 Associated with Preterm Labor in Humans. *Biol. Reprod.* *87*, 96.
- Xia, X.M., Fakler, B., Rivard, A., Wayman, G., Johnson-Pais, T., Keen, J.E., Ishii, T., Hirschberg, B., Bond, C.T., Lutsenko, S., et al. (1998). Mechanism of calcium gating in small-conductance calcium-activated potassium channels. *Nature* *395*, 503–507.
- Xia, X.-M., Zhang, X., and Lingle, C.J. (2004). Ligand-dependent activation of Slo family channels is defined by interchangeable cytosolic domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 5585–5591.

- Xian Tao Li, null, Dyachenko, V., Zuzarte, M., Putzke, C., Preisig-Müller, R., Isenberg, G., and Daut, J. (2006). The stretch-activated potassium channel TREK-1 in rat cardiac ventricular muscle. *Cardiovasc. Res.* 69, 86–97.
- Xiao, Z., Deng, P.-Y., Rojanathammanee, L., Yang, C., Grisanti, L., Permpoonputtana, K., Weinschenker, D., Doze, V.A., Porter, J.E., and Lei, S. (2009). Noradrenergic depression of neuronal excitability in the entorhinal cortex via activation of TREK-2 K⁺ channels. *J. Biol. Chem.* 284, 10980–10991.
- Yancey, P.H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* 208, 2819–2830.
- Yang, S.F., Freer, S., and Benson, A.A. (1967). Transphosphatidylation by Phospholipase D. *J. Biol. Chem.* 242, 477–484.
- Yeom, M., Shim, I., Lee, H.-J., and Hahm, D.-H. (2005). Proteomic analysis of nicotine-associated protein expression in the striatum of repeated nicotine-treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 321–328.
- Yost, C.S., Oh, I., Eger, E.I., and Sonner, J.M. (2008). Knockout of the gene encoding the K2P channel KCNK7 does not alter volatile anesthetic sensitivity. *Behav. Brain Res.* 193, 192–196.
- Zhang, J., and Pratt, R.E. (1996). The AT2 Receptor Selectively Associates with Giα2 and Giα3 in the Rat Fetus. *J. Biol. Chem.* 271, 15026–15033.
- Zhang, G.-M., Wan, F.-N., Qin, X.-J., Cao, D.-L., Zhang, H.-L., Zhu, Y., Dai, B., Shi, G.-H., and Ye, D.-W. (2015a). Prognostic significance of the TREK-1 K2P potassium channels in prostate cancer. *Oncotarget* 6, 18460–18468.
- Zhang, H., Shepherd, N., and Creazzo, T.L. (2008). Temperature-sensitive TREK currents contribute to setting the resting membrane potential in embryonic atrial myocytes. *J. Physiol.* 586, 3645–3656.
- Zhang, J., Cao, M., Wu, X., Chen, Y., Liang, W., and Liang, Y. (2015b). Enhanced expression of TWIK-related arachidonic acid-activated K⁺ channel in the spinal cord of detrusor overactivity rats after partial bladder outlet obstruction. *BMC Urol.* 15.
- Zhang, M., Yin, H.-J., Wang, W.-P., Li, J., and Wang, X.-L. (2016). Over-expressed human TREK-1 inhibits CHO cell proliferation via inhibiting PKA and p38 MAPK pathways and subsequently inducing G1 arrest. *Acta Pharmacol. Sin.*
- Zhang, S., Sun, P., Sun, Z., Zhang, J., Zhou, J., and Gu, Y. (2013). Cortical GABAergic neurons are more severely impaired by alkalosis than acidosis. *BMC Neurol.* 13, 192.
- Zhanhua, C., Gan, J.G.-K., lei, L., Sakharkar, M.K., and Kanguene, P. (2005). Protein subunit interfaces: heterodimers versus homodimers. *Bioinformation* 1, 28–39.
- Zhao, H., Sprunger, L.K., and Simasko, S.M. (2010). Expression of transient receptor potential channels and two-pore potassium channels in subtypes of vagal afferent neurons in rat. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 298, G212–G221.
- Zhou, M., Morais-Cabral, J.H., Mann, S., and MacKinnon, R. (2001). Potassium channel receptor site for the inactivation gate and quaternary amine inhibitors. *Nature* 411, 657–661.
- Zhou, M., Xu, G., Xie, M., Zhang, X., Schools, G.P., Ma, L., Kimelberg, H.K., and Chen, H. (2009). TWIK-1 and TREK-1 are potassium channels contributing significantly to astrocyte passive conductance in rat hippocampal slices. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 8551–8564.
- Zilberberg, N., Ilan, N., and Goldstein, S.A. (2001). KCNKØ: opening and closing the 2-P-domain potassium leak channel entails “C-type” gating of the outer pore. *Neuron* 32, 635–648.

Zobel, C., Cho, H.C., Nguyen, T.-T., Pekhletski, R., Diaz, R.J., Wilson, G.J., and Backx, P.H. (2003). Molecular dissection of the inward rectifier potassium current (IK1) in rabbit cardiomyocytes: evidence for heteromeric co-assembly of Kir2.1 and Kir2.2. *J. Physiol.* 550, 365–372.

Annexe 1

Matériels et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules utilisées pour les transfections sont des HEK TSA 293, Human Embryonic Kidney. Elles ont été cultivées dans des boîtes CORNING® de 10 cm, avec du milieu complet à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂. Ce milieu contient du DMEM (Gibco®) contenant 5% de SVF (Sérum de Veau Fœtal Dustcher®) et d'antibiotiques (pénicilline à 10 000 U/mL et de la streptomycine à 10 000 µg /mL Gibco®). Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont « passées »; c'est-à-dire qu'on les dissocie en les mettant 15 minutes dans 2ml de trypsine (Gibco®). Une fois les cellules en suspension, on les répartit dans de nouvelles boîtes avec du milieu complet.

Certaines expériences décrites plus loin nécessitent que les cellules soient cultivées sur des lamelles de verre. Pour que les cellules adhèrent, nous avons incubé les lamelles pendant 30min à 37°C en présence d'une solution de poly-L-lysine à 0.05g/l (Sigma®). Avant l'incubation des cellules, les lamelles sont lavées une fois avec de l'eau et deux fois avec du DPBS.

Une lignée cellulaire exprimant de manière constitutive le récepteur AT2R a été développée par l'équipe du Dr Priscille Brodin. Des cellules HEK TSA 293 ont été transfectées avec un vecteur exprimant le récepteur AT2R étiqueté avec une séquence SNAP. Les cellules ont ensuite été sélectionnées grâce à l'antibiotique G418 (Sigma®). Pour être maintenues les cellules sont cultivées dans un milieu supplémenté avec du G418 à 500 µg /mL (Sigma®).

Vecteurs

Lors des expériences de transfection, nous avons utilisé plusieurs vecteurs.

Le canal TRAAK, TREK1 et les protéines chimériques (TREK1CtTRAAK et TRAAKcTrek1) ont été clonés dans un vecteur pRES-2-GFP. Celui-ci possède, en aval du site multiple de clonage de l'insert, une séquence IRES suivie d'une séquence codant pour la protéine fluorescente GFP. La machinerie cellulaire reconnaît la séquence IRES, permettant aux cellules transfectées de synthétiser en parallèle le canal et la GFP. La synthèse de la GFP étant toujours moins importante que celle de l'insert, l'utilisation de ce vecteur permet donc de détecter par fluorescence les cellules transfectées.

La chimère AT1R-CtAT2R a été clonée dans un vecteur pCDNA3.1. Ce vecteur d'expression mammifère possède un site multiple de clonage et un promoteur CMV qui donne un fort taux d'expression. Il possède également un gène codant pour la résistance à l'ampicilline.

Obtention des protéines chimères.

Les mutants TREK1CtTRAAK et TRAAKcTrek1 étaient déjà disponibles au laboratoire. Il s'agit du canal TREK-1 ou TRAAK possédant le domaine C-terminal de l'autre canal.

La chimère AT1RCtAT2R a été obtenue grâce à des PCR chevauchantes. La stratégie est schématisée ci-après. Les séquences ainsi que les différents domaines ont été récupérés sur le site SwissProt. Trois PCR ont été nécessaires pour réaliser cette protéine.

La première PCR permet d'isoler AT1R sans sa partie C-terminal (rouge). De plus l'oligo anti-sens possède une partie de la séquence du domaine C-terminal d'AT2R (gris). Les oligos utilisés sont les suivants :

5: S-AT1R-EcoR1

TAT GAATTC ACC **ATGATTCTCA ACTCTTCTAC**

6: R-AT1R-CtAT2R

ATA GCT TAT TTT AAC AAT TGC TGT TTT GTT

Reverse

AACAAAACA**GCAATTGTTAAAATAAGCTAT**

La deuxième PCR permet d'isoler le domaine C-terminal d'AT2R (gris). De plus l'oligo sens possède une partie de la séquence d'AT1R tronquée de son domaine C-terminal (Rouge). Les oligos utilisés sont les suivants :

3: S- AT1R-CtAT2R

AAC AAT TGC TGT TTT GTT GGA

4:R-AT2R-Xho1

AATGGAGACC TTTGTGTCTT AA CTCGAG TAT

Reverse

ATACTCGAGTTAAGACACAAAGGTCTCCATT

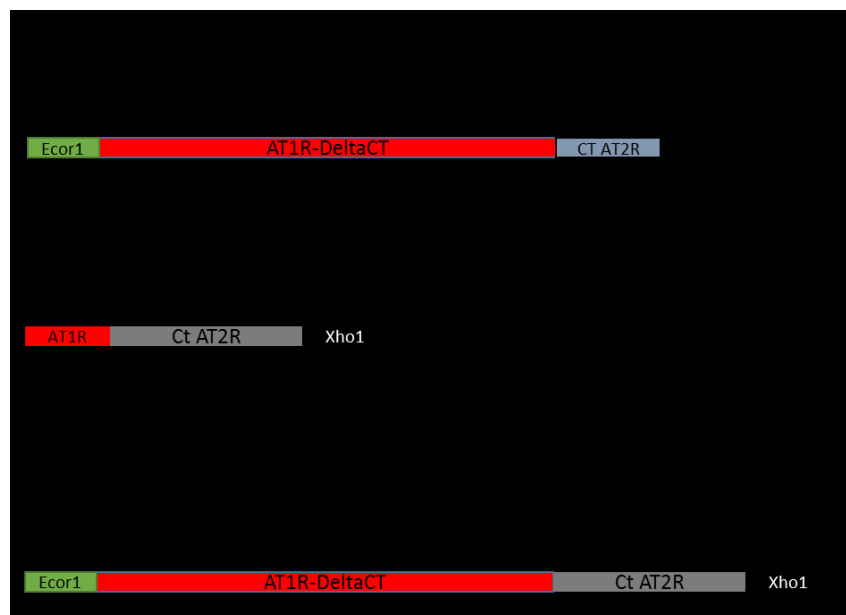


Schéma représentatif de la stratégie de PCR utilisée pour synthétiser la protéine chimère AT1R CtAT2R.

La troisième PCR se fait en présence des produits des PCR 1 et 2 qui vont pouvoir s'apparier entre eux et ainsi donner à la fin de la PCR la séquence de la protéine chimère. On utilise les oligos suivant: 5: S-AT1R-EcoR1, 4:R-AT2R-Xho1

Suite à cela le produit de PCR est digéré par les enzymes EcoR1 et Xho1, puis ligué dans un vecteur pCDNA3.1 préalablement digéré par les mêmes enzymes. La ligation est réalisée grâce à la ligase T4 de Promena® en suivant leur protocole.

Les toxines

Différentes toxines ont été utilisées lors de l'étude de l'interaction d'AT2R avec TRAAK.

La mycolactone : Cette toxine a été fournie par l'équipe de Priscille Brodin, c'est une toxine de synthèse conservée dans des vials en verres opaques. La mycolactone est dissoute dans l'éthanol 100% à une concentration de 3,6 mg/ml. On l'utilise à une concentration de 10µM.

Angiotensine II : Ce ligand (agoniste) d'AT2R (Tocrit®) est conservé dans du DMSO à une concentration de 10⁻²M. On l'utilise à une concentration de 1µM.

C21 : Ce ligand (agoniste) d'AT2R est conservé dans du DMSO à une concentration de 10⁻²M. On l'utilise à une concentration de 10 µM.

EMA401 : Ce ligand (antagoniste) d'AT2R est conservé dans du DMSO à une concentration de 10⁻²M. On l'utilise à une concentration de 10 µM.

PTX : Elle provient de Tocrit® et est stocké à 4°C. Chaque tube fut solubilisé avec de l'eau ultra pure stérile. On utilise la PTX à une concentration de 0,5µg/ml en incubant les cellules toute la nuit.

Transfection au Phosphate de calcium

Les cellules utilisées pour l'électrophysiologie ont été transfectées par la technique dite du phosphate de calcium. Pour cela, l'ADN à transfecter (3.6µg) est mis en solution avec du calcium (8,3µl à 2,5M) pour un volume final de 83 µl. Ce mélange est combiné avec une solution de 83 µl contenant des ions phosphates et tamponnée avec de l'HEPES (pH 7,1). Il se crée alors des précipités de calcium ayant l'ADN à leur surface. Cette suspension est déposée sur les cellules à 80% de confluence en diamètre 35mm pendant au moins 6h. Lors de cette incubation, les cellules incorporent l'ADN par un procédé mal connu. Par la suite, les cellules sont dissociées dans du DPBS et réparties dans des boîtes de diamètre 35mm (CORNING®) pour avoir le lendemain et le surlendemain environ 30% de confluence. Pour l'électrophysiologie, les cellules choisies sont de préférence des cellules isolées. Dans certains cas nous avons réalisé la transfection simultanée de 2 ADNs différents (soit une co-transfection), un canal et du récepteur. Dans ces cas-là, nous avons mis environ 6 fois plus de récepteur (3µg) que de canal (0.5µg). Ce rapport favorisant la transfection du récepteur permet d'être certain que les cellules fluorescentes possèdent les deux protéines.

Patch Clamp

Cette technique, inventée par E. Neher et B. Sakman, permet l'étude électrophysiologique des canaux ioniques. Ceux-ci sont traversés par des flux d'ions très importants (environ 10⁶ ions / seconde), générant ainsi un courant électrique de faible intensité étudiable par la technique du patch-clamp. Les courants électriques globaux mesurés dans des systèmes natifs sont issus de plusieurs types de canaux ioniques et sont donc la somme d'une multitude de courants. Pour étudier le courant spécifique à un canal, on peut le sur-exprimer dans un système hétérologue. Ainsi, la cellule exprime majoritairement notre canal d'intérêt et nous permet d'en étudier les propriétés fonctionnelles. Grâce à différentes configurations de patch clamp, on peut soit mesurer le courant d'un ou quelques canaux (cell-attached, inside-out, outside-out), soit le courant global généré par tous les canaux de la cellule (cellule entière ou whole-cell).

Nos mesures ont été réalisées en configuration cellule entière et cellule attachée.

Configuration cellule entière / cellule attachée

La réalisation de la configuration cellule entière nécessite une microélectrode en verre possédant un diamètre de l'ordre du micromètre (résistance comprise entre 2,5 et 5 m Ω). Elle est obtenue par l'étirement d'un tube à hématocrite en verre de soude (Vitrex[®]) grâce à une étireuse horizontale (Sutter instrument[®] model P-97). La microélectrode est remplie de milieu intrapipette, et ayant la composition suivante: 155 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 5 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid) et 10mM HEPES, pH 7,2. Le milieu extracellulaire a la composition suivante : 150mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂ et 10 mM HEPES, pH 7,2.

Pour configuration cellule attachée la microélectrode doit posséder une résistance comprise entre 1 et 1,5 méga Ω et être remplie de milieu extracellulaire.

La microélectrode est approchée de la surface d'une cellule tout en mesurant la résistance de la pipette. Cette résistance varie en fonction du diamètre de la pipette et de l'obstruction de la pipette ou non. La résistance moyenne de nos pipettes de patch est de 3.5 méga Ω . Lorsque l'électrode entre en contact avec la cellule, on observe une légère augmentation de la résistance de la pipette du fait que la membrane cellulaire a une résistance supérieure à celle du milieu extracellulaire. On réalise alors une légère dépression; la résistance passe alors de quelques mégohms au GigaOhm. Cette augmentation de la résistance traduit le « scellement » entre la pipette et la membrane plasmique on est alors en configuration dite " cellule attachée".

Une deuxième dépression permet de rompre la membrane plasmique sous la pipette, ce qui se traduit par une diminution de la résistance mesurée et permet d'avoir accès au courant de toute la cellule (on est en configuration dite cellule entière). Une fois en cellule entière, nous pouvons enregistrer le courant d'intérêt.

Les courants enregistrés sont filtrés avant la numérisation via un filtre "passe-bas" à 8kHz. Les courants sont ensuite analysés à l'aide du logiciel Clampfit 10, les résultats moyennés et normalisés par un tableur (Microsoft Excel) et les courbes réalisées à l'aide d'un logiciel graphique (SigmaPlot).

Protocole de stimulation:

Pour la stimulation, une rampe dépolarisante a été réalisée. Elle consiste à partir du potentiel de maintien de -80mV de passer de -100 à 50 mV en 0,8 s. Ce type de protocole permet de connaître la quantité de courant en fonction de la différence de potentiel entre le milieu intracellulaire et extracellulaire.

Annexe 2

Methods and pharmaceutical compositions for treating drug addiction

WO 2016026978 A1

Résumé

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for treating drug addiction, preferably alcoholism, ecstasy addiction or cocaine addiction, in a subject in need thereof. In particular, the present invention relates to a method for treating drug addiction in a subject in need thereof comprising administering the subject with a TREK agonist, particularly a TREK1 and/or TREK2 agonist.

Description

METHODS AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS FOR TREATING DRUG ADDICTION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for treating drug addiction in a subject in need thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Addiction is a primary, chronic disease of brain reward, motivation, memory and related circuitry. Dysfunction in these circuits leads to characteristic biological, psychological, social and spiritual manifestations. This is reflected in an individual pathologically pursuing reward and/or relief by substance use and other behaviors.

Addiction is characterized by inability to consistently abstain, impairment in behavioral control, craving, diminished recognition of significant problems with one's behaviors and interpersonal relationships, and a dysfunctional emotional response. Like other chronic diseases, addiction often involves cycles of relapse and remission.

Without treatment or engagement in recovery activities, addiction is progressive and can result in disability or premature death (definition of the American Society of Addiction Medicine).

Drug addiction is a chronic and relapsing condition with a multifactorial etiology that includes genetic, neurobiological, psychological and environmental components. For a long time, psychological and behavior therapies have been considered the most effective long-term treatments. However, understanding of neurobiological mechanisms now permits to envisage promising pharmacotherapies for drug addiction. Since some decades, the research of

medications for treating addictive disorders has increased. Although there are now promising therapeutic approaches for drug addiction, only a few of medications are approved for use in human; these treatments show benefit effects only for a few population of patients and important side effects. Thus, there is a substantial need for innovative therapeutic strategies for drug addictions.

Alcoholism is an example of drug addiction and constitutes a real health problem. The management of alcoholism is today still a stake for scientists and physicians, as the available treatments are not effective enough or involve important side effects.

Baclofen is a GABAB agonist drug approved for muscle spasms and cerebral spasticity. The use of baclofen is proposed for alcohol withdrawal symptoms and as an abstinence-promoting agent in alcohol-dependent subjects although its benefit effects are controverted; this molecule is also used for the treatment of cocaine addiction. However, baclofen shows several types of side effects such as sedation, nausea, muscular weakness and pain and depression. Thus, new therapeutic approaches that permit to increase the ratio benefit/side effect are still needed.

In 2012, Sandoz et al. showed that TREK1 contributes to the hippocampal GABAB response using baclofen (Sandoz et al, Neuron, 2012 June 21; 74(6): 1005- 1014). This document shows that TREK1 is an indirect target of baclofen. However, it does neither show nor suggest that TREK1 and/or TREK2 is a target of alcohol. SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention relates to a TREK agonist for use for treating drug addiction.

In a preferred embodiment, the present invention relates to a TREK agonist for use for treating alcoholism, more preferably chronic alcoholism. In another preferred embodiment, the present invention relates to a TREK agonist for use for treating ecstasy or cocaine addiction. In a particular embodiment, said TREK agonist is a direct TREK agonist. Preferably, the TREK agonist is a TREK1 and/or a TREK2 agonist, preferably a direct TREK1 and/or TREK2 agonist.

In another particular embodiment, the TREK agonist is not a GABAB agonist.

In a further preferred embodiment, the TREK agonist does not bind a GABAB receptor.

The invention further relates to a pharmaceutical composition comprising at least one TREK agonist of the invention for treating drug addiction, preferably alcoholism, ecstasy addiction or cocaine addiction.

The invention also provides a method for screening candidate compounds useful for treating drug addiction, preferably alcoholism, ecstasy addiction or cocaine addiction comprising a step (a) of testing each of the candidate compounds for its ability to activate at least one TREK channel and a step (b) of positively selecting the candidate compound(s) capable of activating said at least one TREK channel.

The inventors highlighted the possible use of the TREK channels TREK1 and TREK2 as a direct therapeutic target for treating alcoholism. They show that the phospholipase D2 (PLD2) specifically potentiates the effect of these channels by producing phosphatidic acid (PA) through hydrolysis of phosphatidylcholine that is present in the environment of said channels. They further show that the phospholipase D2 specifically activates TREK channels by a direct association and that the activity of TREK channels depends on phosphatidic acid production.

The primary alcohols compete with the binding of water to the catalytic site of PLD2 leading to a decrease of the local concentration of phosphatidic acid in the environment of TREK channel. That consequently involves a decrease of TREK activity.

Thus, the inventors surprisingly showed a direct action of alcohol on TREK channels activity and thus propose to directly target TREK channels for treating alcoholism.

This inhibition of TREK channels can be prevented by baclofen but its action is indirect and via GABAB receptors. An action on GABAB receptor implies highly undesirable side effects that could be prevented by a direct action on TREK channels.

The inventors showed that TREK1 is also inhibited by MDMA (also called ecstasy).

Thus, a first object of the invention relates to a TREK agonist for use for treating drug addiction.

As used herein, the term "drug addiction" refers to the compulsive use of chemicals (drugs, alcohol, etc.) and the inability to stop using them despite all the problems caused by their use. Drug addiction is considered as a disease. The term "substance dependence" may also be used.

As used herein, the term "drug addiction" encompasses addiction or dependence to any addictive substance; it includes, but is not limited to, alcohol addiction (also called alcoholism), opioid addiction, sedative, hypnotic or anxiolytic addiction (including benzodiazepine and barbiturate addictions), cocaine addiction, cannabis addiction, amphetamine addiction, ecstasy addiction; hallucinogen addiction, nicotine addiction. Preferably, said drug addiction is chosen among alcoholism, ecstasy addiction and cocaine addiction.

In a preferred embodiment, the invention relates to a TREK agonist for use for treating alcoholism.

As used herein, the term "alcoholism" or "alcohol addiction" has its general meaning in the art and refers to addiction to ethanol particularly contained in alcoholic drinks, which is considered as a disease, specifically an addictive illness, by the World Health Organization (WHO). The WHO differentiates two types of alcoholism: acute alcoholism and chronic alcoholism. In a more preferred embodiment, the invention relates to the treatment of chronic alcoholism.

The term "chronic alcoholism" has its general meaning in the art and corresponds to an excessive regular drink associated with a state of dependency. The WHO defines the state of dependency when some symptoms of the trouble have persisted during at least one month or have repeatedly occurred over a prolonged period of time.

In another preferred embodiment, the invention relates to a TREK agonist for use for treating ecstasy or cocaine addiction. The terms "ecstasy addiction" and "cocaine addiction" refer to addiction to said drugs.

The term "ecstasy" or "MDMA" (3,4-methylenedioxy-N-methylamphetamine) has its general meaning in the art and refers to a well-known empathogenic drug of the phenethylamine and amphetamine classes of drugs.

The term "cocaine" (benzoylmethylecgonine) has its general meaning in the art and refers to a well-known drug which is a tropane alkaloid that is obtained from the leaves of the coca plant. This addictive drug is considered as a hard drug.

As used herein, the term "TREK" or "TREK channels" has its general meaning in the art and refers to a subfamily of K_{2p} channels, more particularly to TREK1 and TREK2.

As used herein, the term "TREK1" has its general meaning in the art and refers to the potassium channel subfamily K member 2 and that in humans is encoded by the KCNK2 gene. It is also called TREK-1, KCNK2, K_{2p}2.1, TPKC1. The term may include naturally occurring TREK1 and variants and modified forms thereof. TREK1 may be from any source, but typically is a mammalian (e.g., human and non-human primate) TREK1, particularly a human TREK1. An exemplary human native TREK1 amino acid sequence is provided in NP 001017424 (GenPept database) and an exemplary human native TREK1 mRNA sequence is provided in NM 001017424 (GenBank database).

As used herein, the term "TREK2" has its general meaning in the art and refers to the potassium channel subfamily K member 10 encoded by the KCNK10 gene. The protein encoded by this gene, also called K_{2p}10.1, is a potassium channel containing two pore-forming P domains. The term may include naturally occurring TREK2 and variants and modified forms thereof. TREK2 may be from any source, but typically is a mammalian (e.g., human and non-human primate) TREK2, particularly a human TREK2. An exemplary human native TREK2 amino acid sequence is provided in NP 066984 (GenPept database) and an exemplary human native TREK1 mRNA sequence is provided in NM 021161 (GenBank database).

The term "TREK agonist" (particularly "TREK1 agonist" and "TREK2 agonist") encompasses any compound, naturally-occurring or synthetic, that specifically activates or promotes the biological activation of TREK channels (particularly TREK1 and TREK2), thereby increasing TREK channels biological activity (particularly TREK1 and/or TREK2 biological activity).

As used herein, the term "TREK channels biological activity" refers to an activity exerted by TREK channels, particularly TREK1 and/or TREK2 which can be assessed by measuring the TREK channel current (particularly TREK1 and/or TREK2 current) by well-known techniques. Such biological activity can be determined in vivo, in situ or in vitro, according to standard techniques and procedures. Particularly, the biological activity of TREK channels (particularly TREK1 and/or TREK2) may be determined by measure of the current of said TREK channels by electrophysiology, more particularly by the two-microelectrode voltage-clamp technique or patch clamp technique. Other techniques may be used, for example using a fluorescent reporter of membrane potential. One of this fluorescent reporter is the DiSBAC. The DiSBAC fluorescence intensity is sensitive to membrane potential. Therefore, if a drug is active on a TREK channel, the fluorescence changes. The cell-based assay using DiSBAC which has been applied to TRAAK (another K_{2P} channel) is well described in Marion et al, 2014, Jun 19 ;157(7): 1565-76. In a preferred embodiment, a TREK agonist of the invention

is a TREK1 and/or TREK2 agonist. According to the invention, a TREK1 and/or TREK2 agonist has an agonist activity on TREK1, on TREK2 or on both TREK1 and TREK2.

Such an activity can be a direct activity, such as an association with a TREK channel ("TREK"), or an enzymatic activity on a second protein, or an indirect activity, such as a cellular process mediated by interaction of TREK channels with a second protein or a series of interactions as in intracellular signaling.

Particularly, said TREK agonist is a direct TREK agonist, such as phosphatidic acid.

As used herein, a "direct TREK agonist" refers to a compound that has a direct activity on TREK channels, particularly TREK1 and/or TREK2, and that does not have an activity on a second protein upstream or downstream. Typically the direct TREK agonist is a direct TREK1 and/or TREK2 agonist, i.e. a direct TREK1 agonist, a direct TREK2 agonist, or a direct TREK1 and TREK2 agonist.

Preferably, according to the invention, said TREK agonist does not have an activity on, typically does not bind, a GABAB receptor, and is not a GABAB agonist.

Preferably, the TREK agonist is not baclofen. This direct activity on TREK channels and particularly without activity on GABAB receptor advantageously allows the decrease or inhibition of any side effects associated with GABAB activation. Such kind of side effects is observed with baclofen, which is a GABAB agonist.

TREK agonists are well known in the art and novel TREK agonists may be found within numerous classes of compounds, including small molecules, antibodies, peptides, nucleic acid molecules, aptamers, and the like. A TREK agonist may be a synthetic or natural compound; it may be a single molecule or mixture or complex of different molecules.

In one embodiment, the TREK agonist (particularly a TREK1 and/or TREK2 agonist) is a small organic molecule.

The term "small organic molecule" refers to a molecule of a size comparable to those organic molecules generally used in pharmaceuticals. The term excludes biological macro molecules (e. g., proteins, nucleic acids, etc.). Preferred small organic molecules range in size up to about 5000 Da, more preferably up to 2000 Da, and most preferably up to about 1000 Da. In one embodiment, the TREK agonist of the invention is a caffeate ester which activates TREK1 channel described in Rodrigues N. et al, European Journal of

Medicinal Chemistry, 2014.

In a particular embodiment, said TREK agonist is a compound of formula (I):

- R1 is CN or CH₂NH₃⁺Cl⁻
- X is O, NH, CH₂.

In another particular embodiment, said TREK agonist is a compound of formula (I) wherein:

- X is O, NH or CH₂.

In further particular embodiment, said TREK agonist is a compound of formula (I) wherein:

- R₁ is CN
- X is O.

In a preferred embodiment, said TREK agonist is cinnamyl 3,4-dihydroxyl-a-cyanocinnamate, which has the following formula (II):

In another preferred embodiment, said TREK agonist is a compound of formula (I) wherein:

- R₁ is CH₂NH₃⁺C¹"
- R₂ is H, and
- X is NH,

and thus is a compound of formula (III):

In another preferred embodiment, said TREK agonist is the compound of formula (IV):

In another preferred embodiment, said TREK agonist is the compound of formula (V):

In another preferred embodiment, said TREK agonist is the compound of formula (VI):

In another particular embodiment, the TREK agonist is a compound illustrated herein below of formula: I),o

r (VIII),

wherein :

- A, when present, is CR₃R₄, where R₃ and R₄, identical or different, are selected from H and an alkyl group from C₁ to C₅, for example C₂, C₃ or C₄, preferably C(Me)₂;
- R₁ and R₂, identical or different, are selected from H, halogen atoms, a (C₁-C₅) alkoxy group, preferably OCH₃ (OMe), and a cyano group (CN). The term "halogen" by himself or as part of another substituent, means, unless otherwise stated, a fluorine (F), chlorine (Cl), bromine (Br), or iodine atom (I). A preferred halogen atom is selected from Cl and Br. Each of R₁ and R₂ are preferably identical and preferentially located on position 3, 6 (see herein below ML67-17 and ML67-18) ;
- L is a substituted or unsubstituted aliphatic molecule (linear chain) including 2 to 5 carbon elements, for example 3 or 4 carbon elements, which is saturated or not, typically a substituted or unsubstituted alkane, alkyne or alkene, for example selected from methane, ethyne, ethene, ethane, propyne, propene, propane, 1, 2-butadiene, 1- butine, butene, butane

and n-pentane; or a substituted or unsubstituted aliphatic cyclic molecule (cyclo-alkane) including 3 to 7 carbon elements, for example 4, 5 or 6 carbon elements, for example selected from cyclopropane, cyclobutane, cyclopentane, cyclohexane and cycloheptane. The substituted or unsubstituted aliphatic cyclic molecule can be saturated or not. When saturated, it is typically a substituted or unsubstituted cyclo-alkyne or cyclo-alkene. L can also be a substituted or unsubstituted heteroalkyl including 2 to 4 carbon elements, or heterocycloalkyl including 3 to 6 carbon elements, further including at least one element selected from oxygen, nitrogen, sulfur and chlorine.

When substituted, L can be bound to one or several substituents consisting in a linear or cyclic aliphatic compound such as herein above defined, typically a linear aliphatic compound comprising 1 to 24 carbon elements or a cyclic aliphatic compound comprising one cycle comprising 3 to 7 carbon elements, for example 4, 5 or 6 carbon elements, or several such cycles, said linear or cyclic aliphatic compound optionally comprising at least one element selected from oxygen, nitrogen, sulfur and chlorine.

In a preferred embodiment, the TREK agonist of formula (VII) is the compound of formula (IX) also herein identified as ML67-17 [trans-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)cyclobutanecarboxylic acid] :

(IX)

In another preferred embodiment, the TREK agonist of formula (VII) is the compound of formula (X) also herein identified as ML67-18 [9-(2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl-3,6-dichloro-9H-carbazole]:

In a further preferred embodiment, the TREK agonist of formula (VII) is the compound of formula (XI) also herein identified as ML67-13 [(3-(3,6-dibromo-9H-carbazol-9-yl)propanoic acid] :

Methods for producing ML67-13, ML67-17 and ML67-18 are well known by the skilled person. Examples of methods for producing ML67-17 and ML67-18 are provided by inventors in the experimental part.

Particularly preferred direct TREK agonists according to the present invention, in particular TREK1 and/or TREK2 agonists, are compound of formula VII or VIII, in particular a compound of formula VII selected from ML67-13, ML67-17 and ML67-18, even more preferably from ML67-17 and ML67-18.

In another particular embodiment, the TREK agonist is 2-Aminoethoxydiphenyl borate, which is known to activate TREK channels (Beltran L. et al, Front Pharmacol., 2013).

Alternatively, the TREK agonist (particularly TREK1 or TREK2 agonist) may consist in an antibody (the term including "antibody portion").

As used herein, "antibody" includes both naturally occurring and non-naturally occurring antibodies. Specifically, "antibody" includes polyclonal and monoclonal antibodies, and monovalent and divalent fragments thereof. Furthermore, "antibody" includes chimeric antibodies, wholly synthetic antibodies, single chain antibodies, and fragments thereof. The antibody may be a human or nonhuman antibody. A nonhuman antibody may be humanized by recombinant methods to reduce its immunogenicity in man. Antibodies are prepared according to conventional methodology. Monoclonal antibodies may be generated using the method of Kohler and Milstein (Nature, 256:495, 1975). To prepare monoclonal antibodies useful in the invention, a mouse or other appropriate host animal is immunized at suitable intervals (e.g., twice-weekly, weekly, twice-monthly or monthly) with antigenic forms of TREK. The animal may be administered a final "boost" of antigen within one week of sacrifice. It is often desirable to use an immunologic adjuvant during immunization. Suitable immunologic adjuvants include Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant, alum, Ribi adjuvant, Hunter's Titermax, saponin adjuvants such as QS21 or Quil A, or CpG-containing immuno stimulatory oligonucleotides. Other suitable adjuvants are well-known in the field. The animals may be immunized by subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, intranasal or other routes. A given animal may be immunized with multiple forms of the antigen by multiple routes.

In one embodiment, the antibody is selected from a monoclonal antibody, a polyclonal antibody, a humanized antibody, a chimeric antibody and any functional portion thereof.

As used herein, "humanized" describes antibodies wherein some, most or all of the amino acids outside the CDR regions are replaced with corresponding amino acids derived from human immunoglobulin molecules. Methods of humanization include, but are not limited to, those described in U.S. Pat. Nos. 4,816,567, 5,225,539, 5,585,089, 5,693,761, 5,693,762 and 5,859,205, which are hereby incorporated by reference. A "humanized" antibody retains a similar antigenic specificity as the original antibody. However, using certain methods of humanization, the affinity and/or specificity of binding of the antibody may be increased using methods of "directed evolution", as described by Wu et al, I. Mol. Biol. 294: 151, 1999, the contents of which are incorporated herein by reference.

Fully human monoclonal antibodies also can be prepared by immunizing mice transgenic for large portions of human immunoglobulin heavy and light chain loci. See, e.g., U.S. Pat. Nos. 5,591,669, 5,598,369, 5,545,806, 5,545,807, 6,150,584, and references cited therein, the contents of which are incorporated herein by reference. In vitro methods also exist for producing human antibodies. These include phage display technology (U.S. Pat. Nos. 5,565,332 and 5,573,905) and in vitro stimulation of human B cells (U.S. Pat. Nos. 5,229,275 and 5,567,610). The contents of these patents are incorporated herein by reference.

Thus, as will be apparent to one of ordinary skill in the art, the present invention also provides for F(ab')₂ Fab, Fv and Fd fragments and single chain antibodies.

In another embodiment, the antibody according to the invention is a single domain antibody. The term "single domain antibody" (sdAb) or "VHH" refers to the single heavy chain variable domain of antibodies of the type that can be found in Camelid mammals which are naturally devoid of light chains. Such VHH are also called "nanobody(R)". According to the invention, sdAb can particularly be llama sdAb.

The various antibody molecules and fragments may derive from any of the commonly known immunoglobulin classes, including but not limited to IgA, secretory IgA, IgE, IgG and IgM. IgG subclasses are also well known to those in the art and include but are not limited to human IgG1, IgG2, IgG3 and IgG4.

According to the invention, such an antibody (or fragment thereof) has an agonistic effect towards TREK channels (particularly TREK1 and/or TREK2).

In another embodiment the TREK agonist (particularly TREK1 and/or TREK2 agonist) is an aptamer.

Aptamers are a class of molecule that represents an alternative to antibodies in term of molecular recognition. Aptamers are oligonucleotide sequences with the capacity to recognize virtually any class of target molecules with high affinity and specificity. Such ligands may be isolated through Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment (SELEX) of a random sequence library, as described in Tuerk C. and Gold L., 1990. The random sequence library is obtainable by combinatorial chemical synthesis of DNA. In this library, each member is a linear oligomer, eventually chemically modified, of a unique sequence. Possible modifications, uses and advantages of this class of molecules have been reviewed in Jayasena S.D., 1999. Peptide aptamers consists of a conformationally constrained antibody variable region displayed by a platform protein, such as E. coli Thioredoxin A that are selected from

combinatorial libraries by two hybrid methods (Colas et al., 1996). Then after raising aptamers directed against TREK as above described, the skilled man in the art can easily select those promoting TREK function.

According to the invention, such an aptamer has an agonistic effect towards TREK channels (particularly TREK1 and/or TREK2).

In another embodiment the TREK agonist may consist in a polypeptide or a nucleic acid which has an agonistic effect towards at least one TREK channel (particularly TREK1 and/or TREK2).

Agonistic activity or effect of a candidate compound towards TREK channels, particularly TREK1 and/or TREK2 channels, may be determined by any well-known method in the art, particularly by screening methods of the invention described below.

A further object of the invention relates to a pharmaceutical composition comprising at least one TREK agonist of the invention for the treatment of drug addiction.

In a preferred embodiment, said pharmaceutical composition is used for the treatment of alcoholism.

In a more preferred embodiment, said pharmaceutical composition is used for the treatment of chronic alcoholism.

In another preferred embodiment, said pharmaceutical composition is used for the treatment of ecstasy or cocaine addiction.

In one embodiment, said at least one TREK agonist is a TREK1 and/or TREK2 agonist.

In a particular embodiment, said at least one TREK agonist is a direct TREK agonist, typically a direct TREK1 and/or TREK2 agonist, i.e. a direct TREK1 agonist, a direct TREK2 agonist, or a direct TREK1 and TREK2 agonist.

In a preferred embodiment, said at least one TREK agonist is not a GABAB receptor agonist.

In another preferred embodiment, said at least one TREK agonist does not bind a GABAB receptor.

Typically, the TREK agonist is not baclofen.

The TREK agonist of the present invention is typically combined with pharmaceutically acceptable excipient(s), and optionally at least one sustained-release matrix, such as a biodegradable polymer, to prepare a pharmaceutical composition. "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refers to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human being, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention

for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. Typically, the pharmaceutical composition contains at least one vehicle which is a pharmaceutically acceptable vehicle for a formulation capable of being injected. This may be in particular an isotonic, sterile, saline solution (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or a dry, especially a freeze-dried composition which upon addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permits the constitution of an injectable solution. The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms. The polypeptide (or nucleic acid encoding thereof) can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active polypeptides in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient

plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion. Some variation in dosage will necessarily occur depending on the subject being treated and on the subject's condition. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject.

A further object of the invention relates to a method for treating drug addiction in a subject in need thereof, said method comprising administering said subject with an effective amount of at least one TREK agonist of the invention.

In a preferred embodiment, said method is for treating alcoholism.

In a more preferred embodiment, said method is for treating chronic alcoholism. In another preferred embodiment, said method is for treating ecstasy or cocaine addiction.

In another embodiment, said at least one TREK agonist is a TREK1 and/or TREK2 agonist.

In a particular embodiment, said at least one TREK agonist is a direct TREK agonist, typically a direct TREK1 and/or TREK2 agonist, i.e. as a direct TREK1 agonist, a direct TREK2 agonist, or a direct TREK1 and TREK2 agonist.

In a preferred embodiment, said at least one TREK agonist is not a GABAB receptor agonist.

In a preferred embodiment, said at least one TREK agonist does not bind a GABAB receptor.

Typically the TREK agonist is not baclofen.

According to the invention, the TREK agonist of the invention is administered to the patient in a therapeutically effective amount.

By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the compound of the present invention (e.g. TREK agonist) to treat the disease (i.e. alcoholism) at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors/conditions including the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound

employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; as well as upon any other factors well known in the medical art. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, typically from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

A further object of the invention relates to a method for screening drugs for use for treating drug addiction, preferably alcoholism, ecstasy addiction or cocaine addiction, comprising the steps of testing compound(s) for its/their ability to be a TREK agonist [typically to bind and activate (open) a TREK channel], and selecting positively the compound(s) that is/are identified as TREK agonist(s).

In another embodiment, said at least one TREK agonist is a TREK1 and/or TREK2 agonist.

In a particular embodiment, said at least one TREK agonist is a direct TREK agonist, typically a direct TREK1 and/or TREK2 agonist, i.e. as a direct TREK1 agonist, a direct TREK2 agonist, or a direct TREK1 and TREK2 agonist.

In a preferred embodiment, said at least one TREK agonist is not a GABAB receptor agonist. Typically the TREK agonist is not baclofen.

In a preferred embodiment, said at least one TREK agonist does not bind a GABAB receptor. In some embodiments, the screening method of the invention comprises a first step of determining whether the candidate compound is able to bind at least one TREK channel, particularly TREK1 and/or TREK2.

Methods for determining whether a candidate compound binds to a protein are well known in the art. Binding of the candidate compound to at least one TREK channel, particularly TREK1 and/or TREK2, can be detected by any of a number of methods known to those of skill in the art. For example, in some embodiments, the candidate compounds are labelled with a detectable label (e.g., a fluorescent label, a colorimetric label, a radioactive label, a spin (spin resonance) label, a radio-opaque label, etc.). The membrane comprising the protein of interest (i.e. TREK channel, particularly TREK1 and/or TREK2) is contacted with the candidate compound, typically washed, and then the membrane is screened for the detectable label indicating association (binding) of the test agent with the protein of interest. In some embodiments a secondary binding moiety (e.g. bearing a label) is used to bind and thereby label the bound test agent, or to bind the protein in which case association of the label on the secondary agent with the label on the test agent indicates binding of the test agent to the protein. In the latter case, in some embodiments, the selected label on the test agent and the selected label on the secondary agent can be labels that undergo fluorescent resonance energy transfer (FRET) so that excitation of one label results in emission from the second label

thereby providing an efficient means of detecting association of the labels. In some embodiments, a competitive binding assay is used. In such assays, a "competitive" agent known to bind to the protein of interest is also utilized. The competitive agent can be labelled and the amount of such agent displaced when the bilayer containing the protein of interest is contacted with a test agent provides a measure of the binding of the test agent. Methods of detecting specific binding are well known and commonly used, e.g. in various immunoassays. Any of a number of well recognized immunological binding assays (see, e.g., U.S. Patents 4,366,241; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837,168) are well suited to detect test agent binding to proteins in a lipid bilayer. For a review of the general immunoassays, see also Asai (1993) *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology 7th Edition*.

In some embodiments, the screening method of the present invention is performed in screening cells. Typically, said screening cells are neurons, such as neurons derived from PC 12 cells or are macrophages, such as Raw267.4; COS-7 and HEK293 cells may also be used. In some embodiments, the screening cells retain a first DNA that encodes at least one TREK channel (particularly TREK1 and/or TREK2), for example two TREK channels Method for introducing a nucleic acid sequence encoding for a protein of interest are well known in the art.

In some embodiments, the screening method consists in determining whether the candidate compound is able to induce hyperpolarisation of the screening cells. The step of contacting the screening cells with a candidate compound is accomplished for example by adding the candidate compound to the saline solution used for the patch clamp assay. The step of contacting a screening cell with a candidate compound for example includes contacting the cell simultaneously with a plurality of candidate compounds simultaneously, such as two or more candidate compounds, or three or more candidate compounds, etc.

Methods for analysing hyperpolarization of a screening cell are well known in the art and typically involve patch-clamp technique. Indeed, single channel ion currents are studied using the patch-clamp technique (see, e.g., Neher and Sakmann (1976) *Nature*, 260: 799-802; Sakmann and Neher (1983) *Single Channel Recording*, Plenum New York), in which a glass pipette filled with electrolyte (i.e. saline solution) is used to contact the membrane surface and measure ionic current. Various chip-based patch clamping methods are also known (see, e.g., Fertig et al. (2002) *Appl. Phys. Letts.*, 81 : 4865-4867). In some embodiments the use of an ex vivo system comprising two chambers separated by a lipid bilayer, that contains channel of the present invention (i.e. TREK channel, particularly TREK1 and/or TREK2). The conductance across the lipid bilayer is monitored continuously. Typically, the TREK channel (particularly TREK1 and/or TREK2) is activated so that the resting membrane potential becomes deeper in the negative direction, or in other words, so that the negative potential increases. The resting membrane potential is preferably deepened in the negative direction to a degree that does not affect cell viability. The induced hyperpolarization is -5; -6; -7; -8; -9; -10; -11; -12; -13; -14; -15; -16; -17; -18; -19; -20; -21; -22; -23; -24; -25; -26; -27; -28; -29; -30; -31; -32; -33; -34; -35; -36; -37; -38; -39; -40; -41; -42; -43; -44; -45; -46; -47; -48; -49; or -50 mV. In some embodiments, the induced hyperpolarization is compared to a predetermined reference value and when the hyperpolarization induced by the candidate compound is higher than the predetermined reference value then the candidate compound is selected. Typically the predetermined reference value represents the hyperpolarization determined in the absence of

the candidate compound or the hyperpolarization induced by a reference compound (for example cinnamyl 3,4-dihydroxyl-a-cyanocinnamate).

In some embodiments, a phenotypic assay could be used for analysing hyperpolarization of a screening cell. Such a phenotypic assay may consist in the cell- based fluorescence assay coupled with image acquisition by automated confocal microscopy. Briefly this assay consists in measuring changes in the fluorescent intensity of a potential-sensitive fluorochrome when the screening cells are contacted with the candidate compound. The potential-sensitive fluorochrome as used herein may be any of the types that are generally available in the art concerned and a suitable one may be selected from among the following: styryl-based potential-sensitive fluorochromes comprising ANEPPSs, ANRPEQs and RHs; cyanine- or oxonol-based potential-sensitive fluorochromes comprising DiSC's, DiOC's, DiIC's, DiBAC's, and DiSBAC's; and rhodamine-derived potential-sensitive fluorochrome such as Rh 123, TMRM, and TMRE. In the present invention, it is more preferred to use styryl-based potential-sensitive fluorochromes comprising ANEPPSs, ANRPEQs and RHs, which are specifically exemplified by di-8-ANEPPS, di-4-ANEPPS, RH-237, RH-1691, di-5- ASP, RH-160, RH-421, RH-795, di-4-ANEPPDHQ, ANNINE-5, and ANNINE-6, and a preferred potential-sensitive fluorochrome may be selected from among these. For fluorescence assay, any type of fluorescent microscope that can be used in the art concerned may be applied in the present invention and a typical example is 1X71 (OLYMPUS Corporation). In the Examples that follow, 1X71 (OLYMPUS Corporation) was used as a fluorescent microscope and combined with a suitable light source unit such as a mercury lamp (OLYMPUS Corporation) or an LED assembly (OLYMPUS Corporation). For the purposes of capturing fluorescent images, imaging and numerical calculations, any models of analysis software for imaging and numerical calculations that can be used in the art concerned may be applied in the present invention. In some embodiments, confocal images are recorded on an automated fluorescent confocal microscope Opera™ (Evotec). Each image is then processed using dedicated image analysis software. In some embodiments, the screening cells (e.g. Raw267.4 cells) are stained with the potential-sensitive fluorochrome for a sufficient time. Then the extracellular dye is washed away and image acquisition is performed (T1). The candidate compound is then added to the assay plate, which is incubated for an additional sufficient time. A second image acquisition is then performed (T2). Automated image analysis determined the average intensities for each well and the intensity ratio is calculated ($[T2_{int}] / [T1_{int}]$). Accordingly, in some embodiments, the screening method of the present invention comprises the steps of i) bringing the candidate compound into contact with screening cells of the present invention previously labeled with potential-sensitive fluorochrome, ii) measuring a test value representative of the fluorescent intensity of the potential-sensitive fluorochrome, iii) comparing the test value measured at step ii) with a predetermined reference value and iv) positively selecting the candidate compound as a TREK agonist when the test value measured at step ii) is at least equal to the predetermined reference value or higher than the predetermined reference value. Typically, the predetermined reference value is the value measured in the absence of the candidate compound or the value measured while using a compound of reference (for example cinnamyl 3,4-dihydroxyl-a- cyanocinnamate).

Typically, the candidate compound may be selected from the group consisting of peptides or polypeptides, peptidomimetics, small organic molecules, antibodies, aptamers and nucleic acids. For example the candidate compound according to the invention may be selected from a library of compounds previously synthesized, or a library of compounds for which the structure is determined in a database, or from a library of compounds that have been

synthesized de novo. In some embodiments, the candidate compound may be selected from small organic molecules.

The screening methods of the invention are very simple. It can be performed with a large number of candidate compounds, serially or in parallel. The method can be readily adapted to robotics. For example, the above assays may be performed using high throughput screening techniques for identifying candidate compounds for developing drugs that may be useful to the treatment or prevention of pain. High throughput screening techniques may be carried out using multi-well plates (e.g., 96-, 384-, or 1536-well plates), in order to carry out multiple assays using an automated robotic system. Thus, large libraries of candidate compounds may be assayed in a highly efficient manner. More particularly, stably-transfected cells growing in wells of micro-titer plates (96 well or 384 well) can be adapted to high through-put screening of libraries of compounds. Compounds in the library will be applied one at a time in an automated fashion to the wells of the microtitre dishes containing the transgenic cells described hereinabove.

In some embodiments, the candidate compound(s) that has/have been positively selected may be subjected to further selection steps in view of further assaying its/their properties in vitro assays or in an animal model organism, such as a rodent animal model system, for the desired therapeutic activity prior to use in humans. Any well-known animal model may be used for exploring the in vivo therapeutic effects of the screened candidate compound(s). For example, the therapeutic activity of the screened candidate compounds can be determined by using an animal model of drug addiction (such as animal model of alcohol, ecstasy or cocaine addiction). Once again the screened candidate compound may be compared to a reference compound such as baclofen. If the screened candidate compound provides the same effects or even better effects than the reference compound, said candidate compound could be typically selected for further clinical investigation.

The invention will be further illustrated by the following examples. However, these examples should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

EXAMPLES

Material and methods

Molecular Biology and Gene Expression. HEK293T cells were transiently co-transfected using Lipofectamine 2000 (INVITROGEN) with a total of 1.6 µg of DNA total per 18 mm diameter cover slip. For co-expression of TREK1, TREK2, or TRAAK with PLD2, PLD1, or PLD2-K758R cells were transfected with a ratio of 1 :4. For co-expression of TREK1 and TREK1 -PCS a ratio of 1 :3 or 1 :5 was used. All channel DNA was used in the pIRES2eGFP vector. TREK1 -PCS was previously made by PCR and introduced into the pIRES2eGFP expression vector. Phospholipase D (PLD) variants were used in the pCGN vector. Chimeras between TREK1 (mouse, DDBJ/EMBL/GenBank accession No. U73488) and TRAAK (mouse, DDBJ/EMBL/GenBank accession No. NM_008431) were generated by PCR. The carboxyl-terminal domain (Ctd) of TRAAK was replaced by the corresponding Ctd of TREK1 (starting at Gly 293) to form TRAAK/Ct-TREK1 and the cytoplasm Ctd of TREK1 was replaced by the corresponding Ctd of TRAAK (starting at Gly 255) to form TREK 1 / Ct-TRAAK. The tandem between PLD2 and TRAAK was made by PCR. The PLD2 was fused to the N-terminus of TRAAK. Hippocampal neurons were transfected at 9 DIV using the

calcium phosphate method. Each 12 mm coverslip received 1 μg of TREK1-PCS DNA and 1 μg of PLD2-K758R DNA or empty vector. Cell Culture. HEK293 cells were maintained in DMEM with 5% FBS on poly-L-lysine-coated glass coverslips. Dissociated hippocampal neurons were obtained from postnatal rats (PO-1) and plated at 75,000 cells/coverslip on poly-L-lysine-coated glass coverslips (12 mM). Neurons were maintained in media containing MEM supplemented with 5% fetal bovine serum, B27 (INVITROGEN), and GlutaMAX (INVITROGEN).

Electrophysiology. HEK293 cell electrophysiology was performed 24-72 h after transfection in solution containing (in mM): 145 NaCl, 4 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂ and 10 HEPES. Glass pipettes of resistance between 3 and 6 M Ω were filled with intracellular solution containing (in mM): 140 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 3 MgCl₂, pH 7.4. Cells were voltage clamped using an Axopatch 200A (Molecular Devices) amplifier in the whole cell mode. Currents were elicited by voltage-ramps (from -100 to 50 mV, 1 s in duration) and the current density was calculated at 0 mV. For alcohol experiment, cells were incubated at least one hour before recording. For inside out patch experiments, the internal solution contained (in mM): 155 KCl, 5 EGTA and 10 HEPES and the external solution contained (in mM) 140 KCl, 10 HEPES, 5 EGTA, 3 MgCl₂, pH 7.4. To confirm the PA-sensitivity of the TREK channel subfamily, 5 μM PA was applied directly to the patches.

Hippocampal neuron whole cell patch clamp electrophysiology was performed 3-6 days after transfection (DIV 12-15 for cultured neurons). For voltage and current clamp experiments in cultured neurons, extracellular solution contained (in mM): 138 NaCl, 1.5 KCl, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 10 glucose, 5 HEPES, 0.002 TTX, pH 7.4. Intracellular solution contained (in mM): 140 K-Gluconate, 10 NaCl, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 2 MgATP, 0.3 Na₂GTP, pH 7.2. Only cells with a resting potential <-45 mV were analyzed.

Optogenetic and electrophysiology. The inventors expressed an engineered TREK1 subunit that renders native TREK1 subject to block by a light-controlled switch. This engineered "photoswitchable conditional subunit", or TREK1-PCS, contains two modifications. The first modification is the introduction of a cysteine attachment site (S121C) near the external mouth of the pore for the covalent attachment of a photoswitchable tethered blocker (PTB). This PTB is called MAQ (Maleimide Azobenzene Quaternary ammonium). In response to 380 nm light, the tethered MAQ isomerizes from a stable trans configuration to a metastable cis configuration and allows the quaternary ammonium moiety to block the channel pore. Block is removed by illumination at 500 nm, which isomerizes MAQ back to the trans configuration. The second modification is a deletion in the TREK1 C-terminal domain that retains TREK1-PCS homomultimeric channels inside the cell. When the TREK1-PCS is expressed in a cell that natively expresses wild-type (WT) TREK1, heteromeric TREK1-PCS/WT channels co-assemble, reach the cell surface and are subject to photo-block. For photoswitching experiments, illumination was controlled using a Polychrome V monochromator (TILL Photonics) through a 20x objective. pClamp software was used for both data acquisition and control of illumination. To conjugate MAQ, cells were incubated in 20-40 μM MAQ for 40 minutes in the dark at room temperature in standard extracellular cell buffer for either HEK293 cells or hippocampal neurons. Cells were washed thoroughly with extracellular buffer before beginning experiments. Immunocytochemistry. Transfected cells on coverslips were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde (15 min at 21-22°C), then permeabilized with PBS and 0.1% Triton X-100 (PBST) and blocked for 1 h with 5% horse serum (HS) in PBST. Primary and secondary antibodies were diluted in PBST and 5%

HS and incubated for 1 h at 21-22°C. Three 5-min washes with PBST were carried out between each incubation step and at the end of the procedure. Coverslips were mounted in Dako[®] Fluorescent Mounting medium (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA). The following antibodies were used: rabbit anti-TREK1 polyclonal antibodies rat monoclonal antibody 3F10 against hemagglutinin (HA) epitope (Roche Diagnostics), goat anti-rabbit IgGs conjugated to Alexa Fluor[®] 488 (Molecular Probes Europe BV, Leiden, The Netherlands), donkey anti-rat IgGs conjugated to Alexa Fluor[®] 594 (MOLECULAR PROBES EUROPE BV, Leiden, The Netherlands). Microscopy analysis and data acquisition were carried out with an Axioplan 2 Imaging Microscope (CARL ZEISS, Le Pecq, France). Immunoprecipitation and Western blot analysis. HEK293T cells were homogenized in PBS containing saponin (0.5% w/v), Triton X-100 (0.5% w/v) and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). Lysates were clarified by centrifugation at 20,000g for 30 min. Anti-TREK1 antibodies were immobilized on protein A-Sepharose 4B fast flow columns (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Immunoprecipitated proteins were separated on 10%> SDS polyacrylamide gel and blotted onto nitrocellulose membranes (Hybond-C extra, AMERSHAM BIOSCIENCES, Freiburg, Germany). Detection was carried out using rat monoclonal antibody 3F10 against hemagglutinin (HA) (ROCHE DIAGNOSTICS).

Results

TREK1 is inhibited by protracted but not acute primary alcohol application.

TREK channels can be stimulated by phospholipids, including directly applied (phosphatidic acid) PA but so far there has been no determination of whether such PA-mediated activation is regulated. Since alcohols target Phospholipase D (PLD) and PLD catalyzes the production of PA, the inventors wondered if alcohol might modulate TREK channels through PLD. A diverse population of potassium channels is directly regulated by ethanol, including BK, SK, Kv and GIRK. The inventors initially investigated the possible regulation of TREK1 by alcohols in a heterologous system. They first tested primary alcohols and found that acute application of either 0.25 % butan-1-ol (27 mM) or 0.6 % ethanol (104 mM) for ~1 minute did not modify TREK1 current in HEK 293T cells (Figure 1A, B). However, protracted (>1 hour) application of either of these primary alcohols reduced TREK1 current by around 50% (Figure 1C, F; current densities were 39 ± 5 pA/pF for TREK1, 18 ± 5 pA/pF for TREK1 + ethanol; $P < 0.05$ and 18 ± 4 pA/pF for TREK1 + butan-1-ol; $P < 0.05$). They then tested secondary alcohols and found that, unlike ethanol or butan-1-ol, protracted application of 0.25 %> butan-2-ol did not modify TREK1 current (Figure 1D, E; current density was 43 ± 6 pA/pF, $P > 0.4$).

The inventors then investigated the potential regulation of native TREK1 current by alcohol in primary cultures of hippocampal neurons. They expressed an engineered TREK1 - Photoconditionnal subunit (TREK1 -PCS) to endow light sensitivity to the native TREK1 channels. As in HEK293T cells, protracted (>1 hour) application of 0.6% of ethanol reduced TREK1 current by around 70% compared to untreated cells (Figure 1F). These results suggest that primary alcohols modulate native and heterogeneously expressed TREK1 channels via an indirect mechanism, such as a metabolic effect on a second messenger that regulates TREK1 .

PLD2-mediated potentiation of TREK1 current is reversed by protracted primary alcohol treatment and the PLD inhibitor FIPI. The inventors next asked whether the observed effects of alcohol on TREK1 could be mediated by PLD. To address this question, they first set out to

determine if PLD can regulate TREK activity. They tested this by co-expressing TREK1 and PLD2. They found that PLD2 co-expression increased TREK1 current by more than 4-fold (Figure. 2A, B; current densities for TREK1 and TREK1 +PLD2 were 19 ± 2 pA/pF and 86 ± 9 pA/pF, respectively; $P < 0.001$).

Since the production of PA by PLD2 is inhibited by primary alcohols, they wondered if protracted treatment with primary alcohols would affect the potentiation of TREK1 by PLD2. In the presence of co-expressed PLD2, protracted application of either ethanol or butan-1-ol reduced TREK1 current by 71% (Figure 2C, D; current densities were 39 ± 5 pA/pF for TREK1 alone, 139 ± 21 pA/pF for TREK1 + PLD2, 24 ± 5 pA/pF for TREK1 + PLD2 + ethanol, and 22 ± 5 pA/pF for TREK1 + PLD2 + butan-1-ol; $P < 0.01$ for TREK1 + PLD2 vs. TREK1 + PLD2 + ethanol and $P < 0.01$ for TREK1 + PLD2 vs. PLD2 + butan-1-ol). This inhibition is reversed after washout within ~ 30 min. Notably, the current densities observed for TREK1 co-expressed with PLD2 and treated with ethanol or butan-1-ol were not significantly different than the current amplitude for TREK1 expressed alone after primary alcohol incubation (Figure 2F; $P > 0.4$ for TREK1 + ethanol vs. TREK1 + PLD2 + ethanol and $P > 0.5$ for TREK1 + butan-1-ol vs. TREK1 + PLD2 + butan-1-ol). Consistent with the previous section, the secondary alcohol butan-2-ol failed to modify TREK1 current when co-expressed with PLD2 (Figure 2F; current density was 127 ± 44 pA/pF, $P > 0.7$). In summary, primary but not secondary alcohols suppressed the ability of PLD2 to enhance current by TREK1 (Figure 2F). Since primary alcohols, but not secondary alcohols, can serve as alternative substrates in PLD-catalyzed transphosphatidylation to produce phosphatidylalcohols instead of PA, these results suggest that the inhibition of TREK1 by primary alcohols is mediated by inhibition of the production of PA by PLD2. To confirm that the effect of alcohol on TREK1 is directly linked to inhibition of PA production, the inventors used the recently developed, specific PLD inhibitor 5-fluoro-2-indolyl des-chlorohalopemide (FIPI). Incubation for one hour with FIPI reduced TREK1 + PLD2 current by 76% to a level similar to primary alcohol incubation (Figure 2E, F; current density was 19 ± 4 pA/pF for TREK1 + PLD2 + FIPI, $P < 0.01$ for TREK1 + PLD2 vs. TREK1 + PLD2 + FIPI). Furthermore, coapplication of primary alcohol and FIPI did not show an additional inhibitory effect indicating that both treatments may work through the same mechanism (Figure 2F; current density was 24 ± 6 pA/pF, $P > 0.4$ for TREK1 + PLD2 + FIPI vs. TREK1 + PLD2 + FIPI + EtOH and $P > 0.6$ for TREK1 + PLD2 + EtOH vs. TREK1 + PLD2 + FIPI + EtOH). In addition, FIPI reduced TREK1 current densities to similar levels with or without PLD2 coexpression as was also observed for primary alcohol treatment.

These results strongly support the idea that PLD2 potentiates TREK1 channel activity through production of PA.

PLD2-mediated potentiation of TREK1 requires basic residues in the TREK1 C terminus. The results so far indicate that the regulation of TREK1 channels by PLD2 depends on the production of PA by PLD2. To further test this idea, the inventors turned our attention to the portion of the TREK1 channel that is known to be essential for PA regulation, and where PA has been conjectured to bind. Stimulation of TREK1 by PA depends on five positively charged residues in the TREK1 carboxyl-terminal domain (Ctd) and the negative charge of the phosphate group of PA. This modulation can be eliminated by mutation of the positively charged residues to produce "TREK1 - pentaA".

To test if the ability to sense phospholipids is required for TREK1 to be potentiated by PLD2, they examined the effect of PLD2 co-expression on TREK1 -pentaA. Unlike in wild-type TREK1, TREK1 -pentaA was not potentiated by PLD2 co-expression.

Together with the suppression of PLD2 modulation of TREK1 by primary alcohols and FIPI, this result argues that enzymatic production of PA by PLD2 is required for stimulation of TREK1 .

A catalytically inactive mutant of PLD2 decreases TREK1 current. These findings that protracted exposure to primary alcohols and FIPI reduces TREK1 current in cells transfected with only TREK1, that the magnitude of this suppression is far greater when PLD2 is co-expressed and that the current that remains after primary alcohol or FIPI treatment is the same whether or not PLD2 is co-expressed, suggest that endogenous PLD2 tonically stimulates TREK1 and that this stimulation is suppressed by primary alcohols or FIPI. In order to test if TREK1 is regulated by endogenous PLD2, the inventors co-expressed a catalytically inactive mutant of PLD2 (PLD2-K758R). Co-expression of PLD2-K758R significantly decreased the TREK1 current (Figure 2G, H; current densities were 51 ± 7 pA/pF and 28 ± 3 pA/pF for TREK1 and TREK1 + PLD2-K758R, respectively; $P < 0.05$). This suppression was similar to that elicited by protracted application of primary alcohols and FIPI. Moreover, protracted primary alcohol application did not further inhibit TREK1 current when PLD2-K758R was co-expressed (Figure 2H; current densities were 30 ± 4 pA/pF for TREK1 + PLD2-K758R + ethanol and $P > 0.6$ and 29 ± 4 pA/pF for TREK1 + PLD2-K758R + butan-1-ol; $P > 0.7$) which is consistent with a dependency of primary alcohol regulation of TREK on PLD2.

The ability of the over-expressed catalytically-inactive form of PLD2 to prevent endogenous wild-type PLD2 from stimulating TREK1 could be explained by competition for localization to the vicinity of TREK1 . The inventors therefore examined this possibility by asking if the channel and enzyme directly associate.

PLD2, but not PLD1, specifically regulates TREK1 through direct interaction. Having found that PLD2 modulates TREK1, the inventors asked whether a related phospho lipase D, PLD1, has the same effect. Whereas co-expression of PLD2 significantly increased TREK1 current (current densities were 168 ± 28 pA/pF for TREK1 + PLD2 versus 41 ± 8 pA/pF for TREK1 alone; $P < 0.001$), co-expression of PLD1 had no effect on TREK1 current (current density was 58 ± 9 pA/pF for TREK1 + PLD1; $P > 0.6$).

They asked whether the ability of PLD2 but not PLD1 to stimulate TREK1 could be accounted for by direct association of only PLD2 with the TREK1 channel. PLD2 was co-immunoprecipitated with TREK1, but PLD1 was not. As a control, in the absence of TREK1 expression, anti-TREK1 antibodies did not precipitate PLD2. Furthermore, using immunocytochemistry, they found that TREK1 and PLD2 co-localize in HEK293T cells, but TREK1 and PLD1 do not. In addition, PLD2-K758R is also coIP with TREK1, confirming the competition hypothesis with an endogenous PLD2 to induce the TREK1 current decrease (Figure 2G).

Taken together, these results indicate that PLD2 interacts with TREK1 but that PLD1 does not and that this explains the exclusive modulation of the channel by PLD2. PLD2 is able to potentiate TREK2, but not TRAAK. Having observed that PLD2 interacts with and regulates

TREK1 but that PLD1 does not, the inventors asked whether the interaction and modulation extend to other members of this K_{2p} subfamily of channels. To test this, they co-expressed PLD2 with TREK2 and the more distantly related TRAAK channel. TREK2 and TRAAK, like TREK1, are lipid and mechano-gated and display the same PA-sensitivity as TREK1. PLD2 co-expression significantly increased TREK2 current (current densities were 24 ± 3 pA/pF for TREK2 alone and 144 ± 29 pA/pF for TREK2 + PLD2; $P > 0.01$) but did not significantly affect TRAAK current (current densities were 8 ± 3 pA/pF for TRAAK alone and 8 ± 3 pA/pF for TRAAK + PLD2; $P > 0.8$). Consistent with these results, PLD2 was co-immunoprecipitated with TREK2, but not with TRAAK. As a control, in the absence of TREK2 expression anti-TREK2 antibodies did not precipitate PLD2, confirming the specificity of the assay. In addition, immunocytochemistry of PLD2 and TREK2 showed co-localization, while TRAAK and PLD2 showed no overlap. Furthermore, they found that PLD1 co-expression does not affect TREK2 current (current densities were 31 ± 11 pA/pF for TREK2 alone and 39 ± 21 pA/pF for TREK2 + PLD1; $P > 0.9$ for TREK2 alone vs. TREK2 + PLD1). These results suggest that PLD2 interacts with, and hence regulates, TREK2, which is closely related to TREK1, but not the more distantly related TRAAK.

Having found that TREK2 resembles TREK1, the inventors asked if it is also similar in the ability to be inhibited by protracted exposure to primary alcohols. They found that, like TREK1, TREK2 current is reduced by protracted exposure to primary alcohols; and, moreover, that this effect is potentiated when PLD2 is over expressed along with TREK2. Unlike TREK1 and TREK2, TRAAK, which is not potentiated by PLD2 over-expression, is not sensitive to protracted exposure to primary alcohols. In summary, TREK1 and TREK2 are similar to one another and differ from the other TREK channel family member TRAAK in the ability to be specifically regulated by primary alcohols via PLD2 through specific interaction between channel and enzyme.

To further test the idea that direct interaction between enzyme and channel is necessary for the channel to be potentiated, the inventors forced an interaction between TRAAK and PLD2 by fusing the proteins to one another to produce a PLD2-TRAAK tandem. PLD2-TRAAK showed significantly increased current compared to TRAAK alone (current densities were 5.5 ± 2 pA/pF for TRAAK alone and 51 ± 13 pA/pF for PLD2-TRAAK; $P < 0.01$). Similarly to TREK1 and TREK2, protracted application of ethanol reduced the current density of PLD2-TRAAK to the amplitude observed for TRAAK alone indicating that PLD2-mediated production of PA is required for the potentiation observed with PLD2-TRAAK. These results are consistent with the notion that anchoring of PLD2 to the channel enables it to regulate the channel's activity via its local enzymatic activity.

The inventors next investigated to which part of the channel PLD2 binds. They hypothesized that this interaction may take place in the Carboxy terminal domain (Ctd) because this is the major part of TREK channels that is accessible to the cytosol and this domain is highly conserved between TREK1 and 2. To test this hypothesis, they designed chimeras between TRAAK and TREK1 to see if they could transfer PLD2 sensitivity to TRAAK. The Ctd of TRAAK was replaced by the corresponding Ctd of TREK1 to form TRAAK/Ct-TREK1 and the Ctd of TREK1 was replaced by the corresponding Ctd of TRAAK to form TREK1/Ct-TRAAK. Unlike wild type TRAAK, TRAAK/Ct-TREK1 was sensitive to PLD2 (current densities were 12 ± 3 pA/pF and 36 ± 7 pA/pF for TRAAK/Ct-TREK1 and TRAAK/Ct-TREK1 + PLD2, respectively; $P < 0.05$). However, TREK1/Ct-TRAAK was not sensitive to PLD2 co-

expression (current densities were 26 ± 4 pA/pF and 29 ± 2 pA/pF for TREK1/Ct-TRAAK and TREK1/Ct-TRAAK + PLD2 respectively, $P > 0.8$).

These results indicate that the specificity of PLD2 depends on the TREK1 Ctd, because the Ctd specifically binds to PLD2.

PA targets native TREK1 channels through physical coupling with endogenous PLD2 in hippocampal neurons. TREK channels are natively expressed in the hippocampus where they contribute to the response to GABAB receptor activation and are inhibited by protracted primary alcohol application (Figure IB). Accordingly, the inventors wondered if hippocampal TREK1 channels are regulated by endogenous PLD2 and if this can explain their alcohol sensitivity. To investigate this regulation in the native hippocampal TREK1 channels, they co-expressed the catalytically inactive mutant of PLD2, PLD2-K758R, along with the TREK1 -PCS.

In cultured hippocampal neurons transfected with the TREK1 -PCS, alternating illumination between 380 nm and 500 nm modulated the resting membrane potential by 4.3 ± 0.9 mV. Co-expression of PLD2-K758R decreased this voltage change significantly (E; 1.3 ± 0.2 mV; $P < 0.01$). Consistent with this, in voltage clamp at a holding potential of -20 mV, TREK1-PCS transfected neurons had photocurrents of 20 ± 4 pA and co-expression of PLD2-K758R reduced the photocurrents to 4.8 ± 1.7 pA (F; $P < 0.01$) as was observed for protracted EtOH application.

These results show that in hippocampal neurons native TREK1 and PLD2 co-assemble and that this co-assembly leads to a tonic increase in TREK1 activity.

Conclusion. The inventors demonstrated that protracted application of primary alcohols inhibits TREK1 and TREK2 and provided evidence that this effect is mediated by PLD2 rather than direct interaction between alcohols and the channel. When exposed to primary alcohols such as ethanol or butan-1-ol, PLD2 catalyzes the production of the biologically inactive phospholipids PEtOH or P-1-BtOH rather than PA (Figure 3). Consistent with the hypothesis that regulation of TREK by alcohols is mediated by removal of tonic stimulation by PLD2, PLD2 is insensitive to secondary alcohols, which were also unable to regulate TREK1 or TREK2. They confirmed this mechanism by showing that primary alcohols also prevent the potentiation effect of PLD2 and that a catalytically inactive mutant of PLD2 is unable to potentiate TREK1 and renders TREK1 insensitive to protracted alcohol treatment. This may be a general mechanism by which ethanol can induce long term physiological changes by changing the phospholipid composition of the membrane. · Example 2

Having highlighted the possible use of the TREK channels TREK1 and TREK2 as a direct therapeutic target for treating alcoholism, the inventors explored the effect of MDMA (ecstasy) on TREK channel.

They showed that TREK1 is inhibited by MDMA by the technique of patch clamp described in the example 1 (Figure 4). The inhibition of TREK1 by MDMA is rapid and reversible, and thus seems to be direct.

Cocaine having generally the same mechanisms of action and working, the inventors reasonably think that cocaine also inhibits TREK channels, particularly TREK1. The inventors thus explore the effect of cocaine on TREK channel by the technique of patch clamp described in the example 1.

In conclusion, the inventors showed that TREK channels could be used as a direct therapeutic target in the treatment of alcoholism and further showed that this new therapeutic approach could be used in other drug addictions such as ecstasy and cocaine addiction.

- Example 3

Material and methods

Molecular Biology and Gene Expression

HEK293T cells were transiently transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with a total of 1.6 µg of DNA total per 18 mm diameter cover slip. TREK1 channel DNA was used in the pIRES2eGFP vector. They were used for electrophysiological studies 1 day after injection.

For xenopus oocytes, dcfolliculated Xetwpus oocytes were injected with cRNA encoding mouse TREK1 (5 ng). They were used for electrophysiological studies 2-4 days after injection.

Cell Culture

HEK293 cells were maintained in DMEM with 5% FBS on poly-L-lysine-coated glass coverslips. Dissociated hippocampal neurons were obtained from postnatal rats (PO-1) and plated at 75,000 cells/coverslip on poly-L-lysine-coated glass coverslips (12 mM). Neurons were maintained in media containing MEM supplemented with 5% fetal bovine serum, B27 (Invitrogen), and GlutaMAX (Invitrogen).

Electrophysiology

HEK293 cell electrophysiology was performed 24-72 h after transfection in solution containing (in mM): 145 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂ and 10 mM HEPES. Glass pipettes of resistance between 3 and 6 MΩ were filled with intracellular solution containing (in mM): 140 KCl, 10 Hepes, 5 EGTA, 3 MgCl₂, pH 7.4. Cells were voltage clamped using an Axopatch 200A (Molecular Devices) amplifier in the whole cell mode. Currents were elicited by voltage-ramps (from -100 to 50 mV, 1 s in duration) and the current density was calculated at 0 mV.

For two electrode voltage clamp, in a 0.5-ml perfusion chamber, a single oocyte was impaled with two standard microelectrodes (1-2.5 MΩ resistance) filled with 3 M KG and maintained under voltage clamp by using a Dagan TEV 200 amplifier, in standard ND96 solution. (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, and 5 mM Hepes, pH 7.4, with NaOH). Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Molecular Devices). To test the effect on the inhibition induced by 100 ml ethanol, inventors first have incubated the cells for an hour prior to test the agonists. They called

"reversion" when the agonist bring back the channel activity to the same level as the activity observed in the absence of ethanol. for the same agonist.

Results

Different agonists were tested either in *Xenopus* oocytes (TEVC) or in HEK cells (patch-clamp). Using 5 μ M of each molecules, ML67-17 allows a 4.2 fold increase of the channel activity in the HEK expression system, ML67-18 allows a 3 fold increase of the channel activity in the *Xenopus* oocytes and a 9 fold increase of the channel activity in the HEK expression system and ML67-13 allows a 3 fold increase of the channel activity in the *Xenopus* oocytes and a 17 fold increase of the channel activity in the HEK expression system. Inventors further observed a 4.3 fold increase of the channel activity in the HEK expression system while using 5 μ M of ML42 (amantadine derivative). ML67-18 and ML67-13 have further been identified as capable of reversing the ethanol TREK1 inhibition.

These results confirm that TREK agonists can be efficiently used for treating drug addiction.
Example 4: Synthesis of ML67-17

MLW-17 (85% trans)

i) NaBH₄, THF, MeOH; ii) TsCl, pyridine, CH₂Cl₂; iii) 3,6-dichlorocarbazole, NaH, DMF; iv) LiOH, MeOH, THF. 3,6-dichlorocarbazole. A round bottom flask was charged with 9H-carbazole (20.0 g, 119.6 mmol) and dichloromethane (200 mL) and the mixture was stirred at 0 °C. Sulfuryl chloride (9.69 mL, 119.6 mmol) was slowly added at that temperature. The dark reaction mixture was stirred at 0 °C for 2h and then diluted with CH₂Cl₂ and aq. NaHCO₃. The organic layer was separated and washed with aq. NaHSO₃, brine, and dried (Na₂SO₄). The solution was then filtered and concentrated to afford the crude product as thick oil. This was recrystallized from hexanes/ethyl acetate to afford 3,6- dichlorocarbazole (12) as a white solid (15.2 g, 54%). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆): 11.56 (s, 1H), 8.27 (d, J=1.8 Hz, 2H), 7.50 (d, J=8.7 Hz, 2H), 7.39 (d, J=8.7 Hz, 2H). tert-butyl 3-(tosyloxy)cyclobutanecarboxylate (3). A mixture of tert-butyl 3-oxocyclobutanecarboxylate (1, 1.50 g, 8.8 mmol) in THF:MeOH (3 : 1, 16 mL) was added dropwise to a stirring slurry of sodium borohydride (0.167 g, 4.4 mmol) in THF (8 mL) in round bottom flask cooled in an ice bath. The mixture was stirred at 0-5 °C for two hours. Water was added dropwise (10 mL) followed by aq. Na₂CO₃, and the mixture was extracted with ethyl acetate. The combined organic layers were washed with brine and dried over sodium sulfate.

After filtration, the organic layer was concentrated to give the crude tert-butyl 3-hydroxycyclobutanecarboxylate (2) as a white semi-solid (2.3 g, 100%), which was used in the next step without purification. p-Toluenesulphonyl chloride (4.201 g, 0.022 moles) was added to a stirring solution of crude tert-butyl 3 hydroxycyclobutanecarboxylate (2, 2.30 g, 8.8 mmol) in dry pyridine (10 mL) and CH₂Cl₂ (20 mL) at 0 °C. The mixture was allowed to warm to room temperature and stirred under nitrogen overnight. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue was partitioned between ethyl ether (100 mL) and 0.5 N aq. HCl (20 mL). The organic layer was separated and washed with saturated NaHCO₃ and brine, and dried (Na₂SO₄). After filtration, the solvent was removed under reduced pressure and the residue purified by silica gel flash chromatography (0-50% EtOAc-hexane) to afford tert-butyl 3- (tosyloxy)cyclobutanecarboxylate (3) as a colorless oil that

slowly solidified at room temperature (2.6 g, 90% yield over 2 steps). ¹H NMR (300 MHz, CDC13): δ 7.79 (d, 2H, J = 8.4 Hz), 7.35 (d, 2H, J = 8.1 Hz), 4.72 (m, 1H), 2.60-2.30 (m, 8H), 1.44 (s, 9H). cis and trans-tert-butyl 3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)cyclobutanecarboxylate

(4). To a stirred solution of 3,6-dichlorocarbazole (5, 694 mg, 2.94 mmol) in dry DMF (15 mL) under nitrogen was added 60% sodium hydride in mineral oil (127 mg, 3.19 mmol). The reaction mixture was stirred at room temperature for 20 min and then at 60°C for 30 minutes, and then cooled to rt. Solid tert-butyl 3-(tosyloxy)cyclobutanecarboxylate (3, 800 mg, 2.45 mmol) was added and the reaction mixture was stirred at 60 °C overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature and quenched with water and extracted with ethyl acetate. The organic layer was separated and washed with brine, dried (Na₂SO₄), filtered, and concentrated. The crude residue was purified over silica gel (0-20% ethyl acetate/hexane) to afford cis-4 as a light yellow syrup which solidified on standing (220 mg), and then trans-4 as colorless syrup which solidified on standing (580 mg). cis-4: ¹H NMR (300 MHz, CDC13): δ 7.99 (d, 2H, J = 1.8 Hz), 7.47 (AB, 2H, J = 8.7 Hz), 7.41 (AB d, 2H, J = 8.7, 1.8 Hz), 5.45 (m, 1H), 3.35-3.15 (m, 3H), 3.00-2.80 (m, 2H), 1.57 (s, 9H). trans-4: ¹H NMR (300 MHz, CDC13): δ 7.99 (d, 2H, J = 2.1 Hz), 7.66 (d, 2H, J = 9.0 Hz), 7.43 (dd, 2H, J = 8.7, 2.1 Hz), 5.08 (m, 1H), 3.40-3.20 (m, 2H), 3.02 (5 peaks, 1H, J = 8.7 Hz), 2.90-2.75 (m, 2H), 1.56 (s, 9H).

trans-3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)cyclobutanecarboxylic acid (ML67-17). A mixture of trans-tert-butyl 3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)cyclobutanecarboxylate (trans-4, 320 mg, 0.82 mmol) and lithium hydroxide monohydrate (336 mg, 8.2 mmol) in THF-MeOH (1 : 1, 10 mL) was stirred at room temperature overnight and then concentrated. The residue was treated with water and adjusted to pH ~ 3 with 2N aq.

HC1. The solids that precipitated out of this solution were collected by filtration, washed with water, and dried in air to afford the title compound (275 mg, >95% yield; 85% trans). ¹H NMR (300 MHz, DMSO- d₆): δ 8.33 (d, 2H, J = 2.1 Hz), 7.87 (d, 2H, J

= 9.0 Hz), 7.47 (dd, 2H, J = 9.0, 2.1 Hz), 5.32 (m, 1H), 3.15-2.90 (m, 3H), 2.85-2.65

(m, 2H); LCMS m/z 331.8 (M-1). • Example 5: Synthesis of ML67-18

i) B1-CH₂CH₂CN, NaH, DMF; ii) NaN₃, NH₄Cl, DMF.

3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propanenitrile (6). A round bottom flask was charged with 3,6-dichlorocarbazole (5, 175 mg, 0.74 mmol), sodium hydride (27 mg, 1.11 mmol) and DMF (5 mL) under nitrogen. The reaction mixture was stirred at 60° C for 30 minutes and 3-bromopropionitrile (62 μL, 0.74 mmol) was added and the reaction mixture stirred at 60° C overnight. The reaction mixture was then cooled to room temperature, diluted with ethyl acetate, and washed with water and brine. The organic solvents were removed under reduced pressure and the residue purified by flash chromatography over silica gel (0-30% ethyl acetate- hexanes) to give 3-(3,6-dichloro- 9H-carbazol-9-yl)propanenitrile (6) as white solid (140 mg, 65%). ¹H NMR (300 MHz, CDC 13) δ 8.00 (dd, J=2.1 & 0.6 MHz, 2H), 7.49 (d, J=2.1 Hz, 1H), 7.46 (d, J=1.8 Hz, 1H), 7.35 (s, 1H), 7.33 (s, 1H), 4.63 (t, J=6.9 Hz, 2H), 2.86 (t, J=6.9 Hz, 2H).

9-(2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl-3,6-dichloro-9H-carbazole (ML67-18). A mixture of 3-(3,6-dichloro-9H-carbazol-9-yl)propanenitrile (6, 140 mg, 0.48 mmol), sodium azide (94 mg, 1.45 mmol) and ammonium chloride (104 mg, 1.94 mmol) in DMF (5 mL) was stirred at 120 °C for 6h, after which time LCMS analysis indicated complete reaction. The reaction mixture was diluted with EtOAc (50 mL), washed with brine, dried over Na₂SO₄, filtered, and concentrated. The crude residue was purified by flash chromatography over silica gel (0-10% MeOH/CH₂Cl₂) to afford 9-(2-(1H-tetrazol-5-yl)ethyl-3,6-dichloro-9H-carbazole (ML67-18) as a beige solid (165 mg, 93%). ¹H NMR (300 MHz, CDC 13) δ 8.23 (d, 1H, J = 1.5 Hz), 8.13 (d, 1H, J = 1.8 Hz), 7.25 (t, 2H, J = 8.1 Hz), 7.05 (t, 1H, J = 7.5 Hz), 6.83 (d, 2H, J = 7.8 Hz), 3.35 (s, 3H), 3.13 (t, 4H, J = 7.2 Hz), 1.31-1.20 (m, 4H), 1.13-0.99 (m, 4H), 0.80 (t, 6H, J = 7.2 Hz); LCMS m/z 444.2 (MH⁺).

Annexe 3

Pharmaceutical compositions comprising an at2r agonist for treating pain

WO 2015189342 A1

Résumé

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for treating pain in subject in need thereof. In particular, the present invention relates to a method of treating pain in a subject thereof comprising administering the subject with at least one agonist of the type 2 angiotensin II receptors (AT2Rs)-TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway.

Description

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING AN AT2R AGONIST FOR TREATING PAIN

FIELD OF THE INVENTION:

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for treating pain in subject in need thereof.

BACKGROUND OF THE INVENTION:

Pain is an unpleasant feeling often caused by intense or damaging stimuli. The International Association for the Study of Pain's widely used definition states: "Pain is an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage." For example, chronic pain is a common problem that presents a major challenge to healthcare providers because of its complex natural history, unclear etiology, and poor response to therapy. Chronic pain is a poorly defined condition. Most authors consider ongoing pain lasting longer than 6 months as diagnostic, and others have used 3 months as the minimum criterion. In chronic pain, the duration parameter is used arbitrarily. Some authors suggest that any pain that persists longer than the reasonable expected healing time for the involved tissues should be considered chronic pain. The pathophysiology of chronic pain is multifactorial and complex and still is poorly understood. Various neuromuscular, reproductive, gastrointestinal, and urologic disorders may cause or contribute to chronic pain. Sometimes multiple contributing factors may be present in a single patient. Chronic pain can result from musculoskeletal disorders such as osteoarthritis/degenerative joint disease/spondylosis, rheumatoid arthritis, Lyme disease, Reiter syndrome, disk herniation/facet osteoarthropathy, fractures/compression fracture of lumbar vertebrae, faulty or poor posture, fibromyalgia, polymyalgia rheumatica, mechanical low back pain, chronic coccygeal pain, muscular strains and sprains, pelvic floor myalgia (levator ani spasm), piriformis syndrome, rectus tendon strain, hernias (e.g. obturator, sciatic, inguinal, femoral, spigelian, perineal, umbilical), abdominal wall myofascial pain (trigger points), chronic overuse syndromes (e.g., tendinitis, bursitis); neurological disorders such as, brachial plexus traction injury, cervical radiculopathy, thoracic outlet syndrome, spinal stenosis, arachnoiditis syndrome, metabolic deficiency myalgias, polymyositis, neoplasia of spinal cord

or sacral nerve, cutaneous nerve entrapment in surgical scar, postherpetic neuralgia (shingles), neuralgia (e.g., iliohypogastric, ilioinguinal, or genitofemoral nerves), polyneuropathies, polyradiculoneuropathies, mononeuritis multiplex, chronic daily headaches, muscle tension headaches, migraine headaches, temporomandibular joint dysfunction, temporalis tendonitis, sinusitis, atypical facial pain, trigeminal neuralgia, glossopharyngeal neuralgia, nervus intermedius neuralgia, sphenopalatine neuralgia, referred dental or temporomandibular joint pain, abdominal epilepsy, abdominal migraine, urologic disorders, bladder neoplasm, chronic urinary tract infection, interstitial cystitis, radiation cystitis, recurrent cystitis, recurrent urethritis, urolithiasis, uninhibited bladder contractions (detrusor-sphincter dyssynergia), urethral diverticulum, chronic urethral syndrome, urethral carbuncle, prostatitis, urethral stricture, testicular torsion, peyronie disease; gastrointestinal disorders such as chronic visceral pain syndrome, gastroesophageal reflux, peptic ulcer disease, pancreatitis, chronic intermittent bowel obstruction, colitis, chronic constipation, diverticular disease, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome; reproductive disorders (extrauterine) such as endometriosis, adhesions, adnexal cysts, chronic ectopic pregnancy, chlamydial endometritis or salpingitis, endosalpingiosis, ovarian retention syndrome (residual ovary syndrome), ovarian remnant syndrome, ovarian dystrophy or ovulatory pain, pelvic congestion syndrome, postoperative peritoneal cysts, residual accessory ovary, subacute salpingo-oophoritis, tuberculous salpingitis; reproductive disorders (uterine) such as adenomyosis, chronic endometritis, atypical dysmenorrhea or ovulatory pain, cervical stenosis, endometrial or cervical polyps, leiomyomata, symptomatic pelvic relaxation (genital prolapse), intrauterine contraceptive device; psychological disorders such as bipolar personality disorders, depression, porphyria, sleep disturbances; and other conditions such as cardiovascular disease (eg, angina), peripheral vascular disease and chemotherapeutic, radiation, or surgical complications.

The modern concept of pain treatment emphasizes the significance of prophylactic prevention of pain, as pain is more easily prevented than it is relieved. Pain is generally controlled by the administration of short acting analgesic agents, steroids and non-steroidal anti-inflammatory drugs. Analgesic agents include opiates, agonistic-antagonistic agents, and antiinflammatory agents. However, all opiates have a wide variety of side effects that can decrease their clinical utility in certain situations. The side effects associated with the use of opiates include respiratory depression, reduced cough reflex, bronchial spasms, nausea, vomiting, release of histamine, peripheral vasodilation, orthostatic hypotension, alteration of vagal nerve activity of the heart, hyperexcitability of smooth muscles (sphincters), reduction of peristaltic motility in the gastrointestinal tract and urinary retention. Opiates also stimulate the release of adrenaline, anti-diuretic hormone, cause changes in the regulation of body temperature and sleep pattern, and are liable to promote the development of tolerance and addiction. In conclusion, there is still a need to provide novel analgesics. SUMMARY OF THE INVENTION:

The present invention relates to methods and pharmaceutical compositions for treating pain in subject in need thereof

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

Mycobacterium ulcerans, the etiological agent of Buruli ulcer, causes extensive skin lesions, which despite their severity are not accompanied by pain. It was previously thought that this

remarkable analgesia is ensured by direct nerve cell destruction. The inventors demonstrate here that *M. ulcerans* -induced hypoesthesia is instead achieved through a specific neurological pathway triggered by the secreted mycobacterial polyketide mycolactone. They decipher this pathway at the molecular level, showing that mycolactone elicits signalling through type 2 angiotensin II receptors (AT2RS), leading to potassium-dependent hyperpolarization of neurons. The inventors further validate the physiological relevance of this mechanism with in vivo studies of pain sensitivity in mice infected with *M. ulcerans*, following the disruption of the identified pathway. These findings shed new light on molecular mechanisms evolved by natural systems for the induction of very effective analgesia, opening up the prospect of new families of analgesics derived from such systems. Accordingly a first object of the present invention relates to a method of treating pain in a subject thereof comprising administering the subject with a therapeutically effective amount of at least one agonist of the type 2 angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway. Treatment may be for any purpose, including the therapeutic treatment of subjects suffering from pain, as well as the prophylactic treatment of subjects who do not suffer from pain (e.g., subjects identified as being at high risk pain). As used herein, the terms "treatment," "treat," and "treating" refer to reversing, alleviating, inhibiting the progress of a disease or disorder as described herein (i.e. pain), or delaying, eliminating or reducing the incidence or onset of a disorder or disease as described herein, as compared to that which would occur in the absence of the measure taken. The terms "prophylaxis" or "prophylactic use" and "prophylactic treatment" as used herein, refer to any medical or public health procedure whose purpose is to prevent the disease herein disclosed (i.e. pain). As used herein, the terms "prevent", "prevention" and "preventing" refer to the reduction in the risk of acquiring or developing a given condition (i.e. pain), or the reduction or inhibition of the recurrence or said condition (i.e. pain) in a subject who is not ill, but who has been or may be near a subject with the condition (i.e. pain). The method of the present invention is suitable in the treatment of a wide range of pain disorders, particularly acute pain, chronic pain, neuropathic pain, inflammatory pain, iatrogenic pain including cancer pain, infectious pain including herpetic pain visceral pain, central pain, dysfunctioning pain including fibromyalgia, nociceptive pain including post-surgical pain, and mixed pain types involving the viscera, gastrointestinal tract, cranial structures, musculoskeletal system, spine, urogenital system, cardiovascular system and CNS, including cancer pain, back and orofacial pain.

Pain is generally be classified as acute or chronic. Acute pain begins suddenly and is short-lived (usually twelve weeks or less). It is usually associated with a specific cause such as a specific injury and is often sharp and severe. It is the kind of pain that can occur after specific injuries resulting from surgery, dental work, a strain or a sprain. Acute pain does not generally result in any persistent psychological response. In contrast, chronic pain is long-term pain, typically persisting for more than three months and leading to significant psychological and emotional problems. Common examples of chronic pain are neuropathic pain (e.g. painful diabetic neuropathy, postherpetic neuralgia), carpal tunnel syndrome, back pain, headache, cancer pain, arthritic pain and chronic post-surgical pain. Clinical pain is present when discomfort and abnormal sensitivity feature among the patient's symptoms. Patients tend to be quite heterogeneous and may present with various pain symptoms. Such symptoms include: 1) spontaneous pain which may be dull, burning, or stabbing; 2) exaggerated pain responses to noxious stimuli (hyperalgesia); and 3) pain produced by normally innocuous stimuli. Although patients suffering from various forms of acute and chronic pain may have similar symptoms, the underlying mechanisms may be different and may, therefore, require different

treatment strategies. Pain can also therefore be divided into a number of different subtypes according to differing pathophysiology, including nociceptive, inflammatory and neuropathic pain.

Nociceptive pain is induced by tissue injury or by intense stimuli with the potential to cause injury. Pain afferents are activated by transduction of stimuli by nociceptors at the site of injury and activate neurons in the spinal cord at the level of their termination. This is then relayed up the spinal tracts to the brain where pain is perceived (Meyer et al., 1994, Textbook of Pain, 13-44). The activation of nociceptors activates two types of afferent nerve fibres. Myelinated A-delta fibres transmit rapidly and are responsible for sharp and stabbing pain sensations, whilst unmyelinated C fibres transmit at a slower rate and convey a dull or aching pain. Moderate to severe acute nociceptive pain is a prominent feature of pain from central nervous system trauma, strains/sprains, burns, myocardial infarction and acute pancreatitis, postoperative pain (pain following any type of surgical procedure), posttraumatic pain, renal colic, cancer pain and back pain. Cancer pain may be chronic pain such as tumour related pain (e.g. bone pain, headache, facial pain or visceral pain) or pain associated with cancer therapy (e.g. postchemotherapy syndrome, chronic postsurgical pain syndrome or post radiation syndrome). Cancer pain may also occur in response to chemotherapy, immunotherapy, hormonal therapy or radiotherapy. Back pain may be due to herniated or ruptured intervertebral discs or abnormalities of the lumbar facet joints, sacroiliac joints, paraspinal muscles or the posterior longitudinal ligament. Back pain may resolve naturally but in some patients, where it lasts over 12 weeks, it becomes a chronic condition which can be particularly debilitating.

Neuropathic pain is currently defined as pain initiated or caused by a primary lesion or dysfunction in the nervous system. Nerve damage can be caused by trauma and disease and thus the term 'neuropathic pain' encompasses many disorders with diverse aetiologies. These include, but are not limited to, peripheral neuropathy, diabetic neuropathy, post herpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, back pain, cancer neuropathy, HIV neuropathy, phantom limb pain, carpal tunnel syndrome, central post-stroke pain and pain associated with chronic alcoholism, hypothyroidism, uremia, multiple sclerosis, spinal cord injury, Parkinson's disease, epilepsy and vitamin deficiency. Neuropathic pain is pathological as it has no protective role. It is often present well after the original cause has dissipated, commonly lasting for years, significantly decreasing a patient's quality of life (Woolf and Mannion, 1999, Lancet, 353, 1959-1964). The symptoms of neuropathic pain are difficult to treat, as they are often heterogeneous even between patients with the same disease (Woolf & Decosterd, 1999, Pain Supp., 6, S141-S147; Woolf and Mannion, 1999, Lancet, 353, 1959-1964). They include spontaneous pain, which can be continuous, and paroxysmal or abnormal evoked pain, such as hyperalgesia (increased sensitivity to a noxious stimulus) and allodynia (sensitivity to a normally innocuous stimulus).

The inflammatory process is a complex series of biochemical and cellular events, activated in response to tissue injury or the presence of foreign substances, which results in swelling and pain (Levine and Taiwo, 1994, Textbook of Pain, 45-56). Arthritic pain is the most common inflammatory pain. Rheumatoid disease is one of the commonest chronic inflammatory conditions in developed countries and rheumatoid arthritis is a common cause of disability. The exact aetiology of rheumatoid arthritis is unknown, but current hypotheses suggest that both genetic and microbiological factors may be important (Grennan & Jayson, 1994, Textbook of Pain, 397-407). It has been estimated that almost 16 million Americans have

symptomatic osteoarthritis (OA) or degenerative joint disease, most of whom are over 60 years of age, and this is expected to increase to 40 million as the age of the population increases, making this a public health problem of enormous magnitude (Houge & Mersfelder, 2002, *Ann Pharmacother.*, .36, 679-686; McCarthy et al., 1994, *Textbook of Pain*, 387-395). Most patients with osteoarthritis seek medical attention because of the associated pain. Arthritis has a significant impact on psychosocial and physical function and is known to be the leading cause of disability in later life. Ankylosing spondylitis is also a rheumatic disease that causes arthritis of the spine and sacroiliac joints. It varies from intermittent episodes of back pain that occur throughout life to a severe chronic disease that attacks the spine, peripheral joints and other body organs.

Another type of inflammatory pain is visceral pain which includes pain associated with inflammatory bowel disease (IBD). Visceral pain is pain associated with the viscera, which encompass the organs of the abdominal cavity. These organs include the sex organs, spleen and part of the digestive system. Pain associated with the viscera can be divided into digestive visceral pain and non-digestive visceral pain. Commonly encountered gastrointestinal (GI) disorders that cause pain include functional bowel disorder (FBD) and inflammatory bowel disease (IBD). These GI disorders include a wide range of disease states that are currently only moderately controlled, including, in respect of FBD, gastro-esophageal reflux, dyspepsia, irritable bowel syndrome (IBS) and functional abdominal pain syndrome (FAPS), and, in respect of IBD, Crohn's disease, ileitis and ulcerative colitis, all of which regularly produce visceral pain. Other types of visceral pain include the pain associated with dysmenorrhea, cystitis and pancreatitis and pelvic pain.

In some embodiments, the method of the present invention is suitable for the treatment of pain resulting from musculo-skeletal disorders, including myalgia, fibromyalgia, spondylitis, sero-negative (non-rheumatoid) arthropathies, non-articular rheumatism, dystrophinopathy, glycogenosis, polymyositis and pyomyositis; - heart and vascular pain, including pain caused by angina, myocardial infarction, mitral stenosis, pericarditis, Raynaud's phenomenon, scleredoma and skeletal muscle ischemia.

In some embodiments, the method of the present invention is suitable for the treatment of head pain, such as migraine (including migraine with aura and migraine without aura), cluster headache, tension-type headache mixed headache and headache associated with vascular disorders.

In some embodiments, the method of the present invention is suitable for the treatment of orofacial pain, including dental pain, otic pain, burning mouth syndrome and temporomandibular myofascial pain.

In some embodiments, the method of the present invention is particularly suitable for the treatment of chronic pain which results from musculoskeletal disorders such as osteoarthritis/degenerative joint disease/spondylosis, rheumatoid arthritis, lyme disease, reiter syndrome, disk herniation facet osteoarthropathy, fractures/compression fracture of lumbar vertebrae, faulty or poor posture, fibromyalgia, polymyalgia rheumatica, mechanical low back pain, chronic coccygeal pain, muscular strains and sprains, pelvic floor myalgia (levator ani spasm), piriformis syndrome, rectus tendon strain, hernias (e.g. obturator, sciatic, inguinal, femoral, spigelian, perineal, umbilical), abdominal wall myofascial pain (trigger points),

chronic overuse syndromes (e.g., tendinitis, bursitis); neurological disorders such as, brachial plexus traction injury, cervical radiculopathy, thoracic outlet syndrome, spinal stenosis, arachnoiditis syndrome, metabolic deficiency myalgias, polymyositis, neoplasia of spinal cord or sacral nerve, cutaneous nerve entrapment in surgical scar, postherpetic neuralgia (shingles), neuralgia (e.g., iliohypogastric, ilioinguinal, or genitofemoral nerves), polyneuropathies, polyradiculoneuropathies, mononeuritis multiplex, chronic daily headaches, muscle tension headaches, migraine headaches, temporomandibular joint dysfunction, temporalis tendonitis, sinusitis, atypical facial pain, trigeminal neuralgia, glossopharyngeal neuralgia, nervus intermedius neuralgia, sphenopalatine neuralgia, referred dental or temporomandibular joint pain, abdominal epilepsy, abdominal migraine, urologic disorders, bladder neoplasm, chronic urinary tract infection, interstitial cystitis, radiation cystitis, recurrent cystitis, recurrent urethritis, urolithiasis, uninhibited bladder contractions (detrusor-sphincter dyssynergia), urethral diverticulum, chronic urethral syndrome, urethral carbuncle, prostatitis, urethral stricture, testicular torsion, peyronie disease; gastrointestinal disorders such as chronic visceral pain syndrome, gastroesophageal reflux, peptic ulcer disease, pancreatitis, chronic intermittent bowel obstruction, colitis, chronic constipation, diverticular disease, inflammatory bowel disease, irritable bowel syndrome; reproductive disorders (extrauterine) such as endometriosis, adhesions, adnexal cysts, chronic ectopic pregnancy, chlamydial endometritis or salpingitis, endosalpingiosis, ovarian retention syndrome (residual ovary syndrome), ovarian remnant syndrome, ovarian dystrophy or ovulatory pain, pelvic congestion syndrome, postoperative peritoneal cysts, residual accessory ovary, subacute salpingo-oophoritis, tuberculous salpingitis; reproductive disorders (uterine) such as adenomyosis, chronic endometritis, atypical dysmenorrhea or ovulatory pain, cervical stenosis, endometrial or cervical polyps, leiomyomata, symptomatic pelvic relaxation (genital prolapse), intrauterine contraceptive device; psychological disorders such as bipolar personality disorders, depression, porphyria, sleep disturbances; and other conditions such as cardiovascular disease (eg, angina), peripheral vascular disease and chemotherapeutic, radiation, or surgical complications. In some embodiments the method of the present invention is particularly suitable for the treatment of pain which results from autoimmune diseases including multiple sclerosis, neurodegenerative disorders, neurological disorders including epilepsy and senso-motor pathologies, irritable bowel syndrome, osteoarthritis, rheumatoid arthritis, neuropathological disorders, functional bowel disorders, inflammatory bowel diseases, pain associated with dysmenorrhea, pelvic pain, cystitis, pancreatitis, migraine, cluster and tension headaches, diabetic neuropathy, peripheral neuropathic pain, sciatica, causalgia, and conditions of lower urinary tract dysfunction.

In some embodiments, the prophylactic methods of the invention are particularly suitable for subjects who are identified as at high risk for pain. Typically subject that are risk for pain include patient that will have a surgical operation.

As used herein the term "TRAAK" has its general meaning in the art and refers to TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel. TRAAK is also known as Homo sapiens potassium channel, subfamily K, member 4 (KCNK4). This protein is a member of the superfamily of potassium channel proteins containing two pore-forming P domains. The encoded protein dimerizes and functions as an outwardly rectifying channel. It is expressed primarily in neural tissues and is stimulated by membrane stretch and polyunsaturated fatty acids. Accordingly, the term "TRAAK agonist" used herein relates to any compound binding specifically to, and thus stimulating, TRAAK.

As used herein the term "AT2R" has its general leaning in the art and refers to type 2 angiotensin II receptor. Accordingly, the term "angiotensin II type 2 receptor agonist" used herein relates to any compound binding specifically to, and thus stimulating, angiotensin II type 2 receptors.

As used herein the term "type 2 angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway" refers to the pathway deciphered in the EXAMPLE. This novel pathway consists of the activation of TRAAK by the stimulation of AT2R receptors in neurons. This pathway leads to the hyperpolarization of the neurons. As used herein the term agonist of the type 2 angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway refers to any compounds which activate this pathway. In some embodiments, the agonist of the type 2 angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway is an AT2R agonist or a TRAAK agonist. The agonist used according to the invention may be any substance, derived from natural sources or from synthesis by chemical and/or genetic engineering methods. Agonists typically include but are not limited to small organic molecule, peptides, polypeptides (including antibodies), nucleic acids (e.g. aptamers).

AT2R agonists are well known in the art (Steckelings UM, Unger T. Angiotensin II type 2 receptor agonists—where should they be applied? *Expert Opin Investig Drugs*. 2012 Jun;21(6):763-6. doi: 10.1517/13543784.2012.681046. Epub 2012 Apr 21.; Steckelings UM, Paulis L, Unger T, Bader M. Emerging drugs which target the renin-angiotensin-aldosterone system. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2011 Dec; 16(4):619-30. doi: 10.1517/14728214.2011.618495. Epub 2011 Sep 12. Review.; Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, Namsolleck P, Dahlöf B, Unger T. Non-peptide AT2-receptor agonists. *Curr Opin Pharmacol*. 2011 Apr; 11(2): 187-92.).

For example, AT2R agonists include compounds of formula I which are disclosed in US 20120035232, I

wherein

R¹ represents H;

R² and R³ independently represent H, Ci-β alkyl, Ci-β alkoxy, Ci-6 alkoxy-Ci-6-alkyl or halo;

Y_i, Y₂, Y₃ and Y₄ independently represent— CH— or— CF— ;

Z_i represents— S— ;

Z₂ represents— CH— or— N— ;

R⁴ represents— S(0)₂N(H)C(0)R⁶,— S(0)₂N(H)S(0)₂R⁶,— C(0)N(H)S(0)₂R⁶; R⁵ represents Ci-6 alkyl, C1-5 alkoxy, Ci-e alkoxy-Ci-6-alkyl or di-Ci-3-alkylamino-Ci-4-alkyl; and

R⁶ represents C 1-5 alkyl, C1-5 alkoxy, Ci-6 alkoxy-Ci-6-alkyl, C1-3 alkoxy-Ci-6-alkoxy, Ci-6 alkylamino or di-Ci-6 alkylamino;

or a pharmaceutically-acceptable salt thereof,

In some embodiments, the AT2R agonist of the present invention is selected from the group consisting of:

N-Butyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2- sulfonamide;

N-iso-butyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butyl-thiophene-2-sulfonamide;

N-iso-propyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butyl-thiophene-2-sulfonamide;

N-(butoxyacetyl)-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2- sulfonamide;
N-butyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-butylthiophene-2- sulfonamide;

N-(butylamino)carbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butyl-thiophene-2-sulfonamide;

N-butylsulfonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2- sulfonamide;

N-butylsulfonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2- carboxamide;

N-(2-methoxyethoxy)carbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2-sulfonamide;

N-ethyloxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2- sulfonamide;

N-tert-butyl oxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmetbylphenyl)-5-iso-butyl-thiophene-2-sulfonamide;

N-butyloxycarbonyl-3-[4-(4-methylimidazol-1-ylmethyl)phenyl]-5-iso-butylthiophene-2-sulfonamide;

N-(N-butyl-N-methylamino)carbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmethylphenyl)-5-iso-butylthiophene-2-sulfonamide; and

N-butyl oxycarbonyl-3-(4-imidazol-1-ylmetbylphenyl)-5-(2-methoxyethyl)-thiophene-2-sulfonamide.

Other examples of AT2R agonists include those described in WO1999043339, and WO1996039164, WO2012070936. In some embodiments, the AT2R agonist is a peptide or a peptide mimetic with high selectivity for the AT2R. Examples of peptides functioning as AT2R agonist and thus suitable for use according to the present invention are p-aminophenylalanine⁶-angiotensin II or N-nicotinoyl-Tyr-(N-a-CBZ-Arg)-Lys-His-Pro-Ile-OH. When p-aminophenylalanine⁶-angiotensin II is used, it is typically administered to the patient directly into the blood. A peptide mimetic may contain elements that enforce steric constraints of a peptide and a peptide mimetic may retain some peptidic character. A peptide

mimetic may alternatively be lacking peptidic fragments and consist of an organic molecule. A peptide mimetic can be an organic molecule comprising biaryl, arylheteroaryl, or biheteroaryl fragments that can be attached to a nitrogen containing monocyclic or bicyclic heterocycle by a one, two or three atom linker. A selective AT₂R agonist may be an analogue of the non-selective angiotensin II type 2 receptor ligand 5,7-dimethyl-2-ethyl-3-[4-[2-(n-butylloxycarbonylsulfonamido)-5-isobutyl-3-thienyl]phenyl]methyl-imidazo[4,5-b]pyridine. According to the invention, the compound of the present invention is administered to the patient with a therapeutically effective amount. By a "therapeutically effective amount" is meant a sufficient amount of the compound of the present invention to treat the disease (i.e. pain) at a reasonable benefit/risk ratio applicable to any medical treatment. It will be understood that the total daily usage of the compounds and compositions of the present invention will be decided by the attending physician within the scope of sound medical judgment. The specific therapeutically effective dose level for any particular patient will depend upon a variety of factors including the age, body weight, general health, sex and diet of the patient; the time of administration, route of administration, and rate of excretion of the specific compound employed; the duration of the treatment; drugs used in combination or coincidental with the specific polypeptide employed; and like factors well known in the medical arts. For example, it is well known within the skill of the art to start doses of the compound at levels lower than those required to achieve the desired therapeutic effect and to gradually increase the dosage until the desired effect is achieved. However, the daily dosage of the products may be varied over a wide range from 0.01 to 1,000 mg per adult per day. Typically, the compositions contain 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 25.0, 50.0, 100, 250 and 500 mg of the active ingredient for the symptomatic adjustment of the dosage to the patient to be treated. A medicament typically contains from about 0.01 mg to about 500 mg of the active ingredient, typically from 1 mg to about 100 mg of the active ingredient. An effective amount of the drug is ordinarily supplied at a dosage level from 0.0002 mg/kg to about 20 mg/kg of body weight per day, especially from about 0.001 mg/kg to 7 mg/kg of body weight per day.

The compound of the present invention is typically combined with pharmaceutically acceptable excipients, and optionally sustained-release matrices, such as biodegradable polymers, to form pharmaceutical compositions. "Pharmaceutically" or "pharmaceutically acceptable" refer to molecular entities and compositions that do not produce an adverse, allergic or other untoward reaction when administered to a mammal, especially a human, as appropriate. A pharmaceutically acceptable carrier or excipient refers to a non-toxic solid, semi-solid or liquid filler, diluent, encapsulating material or formulation auxiliary of any type. In the pharmaceutical compositions of the present invention for oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, transdermal, local or rectal administration, the active principle, alone or in combination with another active principle, can be administered in a unit administration form, as a mixture with conventional pharmaceutical supports, to animals and human beings. Suitable unit administration forms comprise oral-route forms such as tablets, gel capsules, powders, granules and oral suspensions or solutions, sublingual and buccal administration forms, aerosols, implants, subcutaneous, transdermal, topical, intraperitoneal, intramuscular, intravenous, subdermal, transdermal, intrathecal and intranasal administration forms and rectal administration forms. Typically, the pharmaceutical compositions contain vehicles which are pharmaceutically acceptable for a formulation capable of being injected. These may be in particular isotonic, sterile, saline solutions (monosodium or disodium phosphate, sodium, potassium, calcium or magnesium chloride and the like or mixtures of such salts), or dry, especially freeze-dried compositions which upon

addition, depending on the case, of sterilized water or physiological saline, permit the constitution of injectable solutions. The pharmaceutical forms suitable for injectable use include sterile aqueous solutions or dispersions; formulations including sesame oil, peanut oil or aqueous propylene glycol; and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersions. In all cases, the form must be sterile and must be fluid to the extent that easy syringability exists. It must be stable under the conditions of manufacture and storage and must be preserved against the contaminating action of microorganisms, such as bacteria and fungi. Solutions comprising compounds of the invention as free base or pharmacologically acceptable salts can be prepared in water suitably mixed with a surfactant, such as hydroxypropylcellulose. Dispersions can also be prepared in glycerol, liquid polyethylene glycols, and mixtures thereof and in oils. Under ordinary conditions of storage and use, these preparations contain a preservative to prevent the growth of microorganisms. The polypeptide (or nucleic acid encoding thereof) can be formulated into a composition in a neutral or salt form. Pharmaceutically acceptable salts include the acid addition salts (formed with the free amino groups of the protein) and which are formed with inorganic acids such as, for example, hydrochloric or phosphoric acids, or such organic acids as acetic, oxalic, tartaric, mandelic, and the like. Salts formed with the free carboxyl groups can also be derived from inorganic bases such as, for example, sodium, potassium, ammonium, calcium, or ferric hydroxides, and such organic bases as isopropylamine, trimethylamine, histidine, procaine and the like. The carrier can also be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), suitable mixtures thereof, and vegetable oils. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. The prevention of the action of microorganisms can be brought about by various antibacterial and antifungal agents, for example, parabens, chlorobutanol, phenol, sorbic acid, thimerosal, and the like. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars or sodium chloride. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by the use in the compositions of agents delaying absorption, for example, aluminium monostearate and gelatin. Sterile injectable solutions are prepared by incorporating the active polypeptides in the required amount in the appropriate solvent with several of the other ingredients enumerated above, as required, followed by filtered sterilization. Generally, dispersions are prepared by incorporating the various sterilized active ingredients into a sterile vehicle which contains the basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the preferred methods of preparation are vacuum-drying and freeze-drying techniques which yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. Upon formulation, solutions will be administered in a manner compatible with the dosage formulation and in such amount as is therapeutically effective. The formulations are easily administered in a variety of dosage forms, such as the type of injectable solutions described above, but drug release capsules and the like can also be employed. For parenteral administration in an aqueous solution, for example, the solution should be suitably buffered if necessary and the liquid diluent first rendered isotonic with sufficient saline or glucose. These particular aqueous solutions are especially suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous and intraperitoneal administration. In this connection, sterile aqueous media which can be employed will be known to those of skill in the art in light of the present disclosure. For example, one dosage could be dissolved in 1 ml of isotonic NaCl solution and either added to 1000 ml of hypodermoclysis fluid or injected at the proposed site of infusion.

Some variation in dosage will necessarily occur depending on the condition of the subject being treated. The person responsible for administration will, in any event, determine the appropriate dose for the individual subject. A further object of the present invention relates to a method for screening a plurality of test compounds useful for treatment of pain comprising the steps consisting of (a) testing each of the test compounds for its ability to activate the angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK- related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway and (b) positively selecting the test compounds capable of said activation. In some embodiments, the screening method of the invention comprises a first step of determining whether the test compound is able to bind to TRAAK or AT2R. Methods for determining whether a test compound binds to a protein are well known in the art. Binding of the test compound to the amyloid channel protein(s) can be detected by any of a number of methods known to those of skill in the art. For example, in some embodiments, the test compounds are labeled with a detectable label (e.g., a fluorescent label, a colorimetric label, a radioactive label, a spin (spin resonance) label, a radioopaque label, etc.). The membrane comprising the protein of interest (i.e. AT2R or TRAAK) is contacted with the test compound, typically washed, and then the membrane is screened for the detectable label indicating association of the test agent with the protein of interest. In some embodiments a secondary binding moiety (e.g. bearing a label) is used to bind and thereby label the bound test agents, or to bind the protein in which case association of the label on the secondary agent with the label on the test agent indicates binding of the test agent to the protein. In the latter case, in some embodiments, the label on the test agent and the label on the secondary agent can be labels selected that undergo fluorescent resonance energy transfer (FRET) so that excitation of one label results in emission from the second label thereby providing an efficient means of detecting association of the labels. In some embodiments, a competitive binding assay as described in the EXAMPLE is used. In such assays, a "competitive" agent known to bind to the protein of interest is also utilized. The competitive agent can be labeled and the amount of such agent displaced when the bilayer containing the protein of interest is contacted with a test agent provides a measure of the binding of the test agent. Methods of detecting specific binding are well known and commonly used, e.g. in various immunoassays. Any of a number of well recognized immunological binding assays (see, e.g., U.S. Patents 4,366,241 ; 4,376,110; 4,517,288; and 4,837, 168) are well suited to detection of test agent binding to proteins in a lipid bilayer. For a review of the general immunoassays, see also Asai (1993) *Methods in Cell Biology Volume 37: Antibodies in Cell Biology*, Academic Press, Inc. New York; Stites & Terr (1991) *Basic and Clinical Immunology 7th Edition*.

In some embodiments, the screening method of the present invention is performed in screening cells. Typically, said screening cells are neurons, such as neurons derived from PC 12 cells or are macrophages, such as Raw267.4 as described in the EXAMPLE. In some embodiments, the screening cells express a first DNA that encodes a TRAAK channel and optionally a second DNA encoding for AT2R. In some embodiments, the screening cells express a first DNA that encodes or express a TRAAK channel and a second DNA encoding for AT2R. Method for introducing a nucleic acid sequence encoding for a protein of interest are well known in the art.

In some embodiments, the screening method consists in determining whether the test compound is able to induce hyperpolarisation of the screening cells. The step of contacting the screening cells with a test compound is accomplished for example by adding the test compound to the saline solution used for the patch clamp assay. The step of contacting a screening cell with a test compound also includes contacting the cell with a plurality of test

compounds simultaneously, such as two or more test compounds, or three or more test compounds, etc.

Methods for analysing hyperpolarization of a screening cell are well known in the art and typically involve patch-clamp technique as described in the EXAMPLE. Indeed, single channel ion currents are studied using the patch-clamp technique (see, e.g., Neher and Sakmann (1976) *Nature*, 260: 799-802; Sakmann and Neher (1983) *Single Channel Recording*, Plenum New York), in which a glass pipette filled with electrolyte (i.e. saline solution) is used to contact the membrane surface and measure ionic current. Various chip-based patch clamping methods are also known (see, e.g., Fertig et al. (2002) *Appl. Phys. Letts.*, 81: 4865-4867). In some embodiments the use of an ex vivo system comprising two chambers separated by a lipid bilayer, that contains channel of the present invention (i.e. TRAAK). The conductance across the lipid bilayer is monitored continuously. Typically, the TRAAK channel is activated so that the resting membrane potential becomes deeper in the negative direction, or in other words, so that the negative potential increases. The resting membrane potential is preferably deepened in the negative direction to a degree that does not affect cell viability. The induced hyperpolarization is -5; -6; -7; -8; -9; -10; -11; -12; -13; -14; -15; -16; -17; -18; -19; -20; -21; -22; -23; -24; -25; -26; -27; -28; -29; -30; -31; -32; -33; -34; -35; -36; -37; -38; -39; -40; -41; -42; -43; -44; -45; -46; -47; -48; -49; or -50 mV. In some embodiments, the induced hyperpolarization is compared to a predetermined reference value and when the hyperpolarization induced by the test compound is higher than the predetermined reference value then the test compound is selected. Typically the predetermined reference value represents the hyperpolarization determined in the absence of the test compound or the hyperpolarization induced by a reference compound (i.e. a compound which is known to activate the pathway of the present invention). Said reference compound is for example the myco lactone toxin as described in the EXAMPLE. In some embodiments, a phenotypic assay could be used for analysing hyperpolarization of a screening cell. Such a phenotypic assay may consist in the cell-based fluorescence assay coupled with image acquisition by automated confocal microscopy as described in the EXAMPLE. Briefly this assay consists of measuring changes in the fluorescent intensity of a potential-sensitive fluorochrome when the screening cells are contacted with the test compound. The potential-sensitive fluorochrome as used herein may be any of the types that are generally available in the art concerned and a suitable one may be selected from among the following: styryl-based potential-sensitive fluorochromes comprising ANEPPSs, ANRPEQs and RHs; cyanine- or oxonol-based potential-sensitive fluorochromes comprising DiSC's, DiOC's, DiIc's, DiBAC's, and DiSBAC's; and rhodamine-derived potential-sensitive fluorochrome such as Rh 123, TMRM, and TMRE. In the present invention, it is more preferred to use styryl-based potential-sensitive fluorochromes comprising ANEPPSs, ANRPEQs and RHs, which are specifically exemplified by di-8-ANEPPS, di-4-ANEPPS, RH-237, RH-1691, di-5-ASP, RH-160, RH-421, RH-795, di-4-ANEPPDHO, ANNGNE-5, and ANNGNE-6, and a preferred potential-sensitive fluorochrome may be selected from among these. For fluorescence assay, any type of fluorescent microscope that can be used in the art concerned may be applied in the present invention and a typical example is 1X71 (OLYMPUS Corporation). In the Examples that follow, 1X71 (OLYMPUS Corporation) was used as a fluorescent microscope and combined with a suitable light source unit such as a mercury lamp (OLYMPUS Corporation) or an LED assembly (OLYMPUS Corporation). For the purposes of capturing fluorescent images, imaging and numerical calculations, any models of analysis software for imaging and numerical calculations that can be used in the art concerned may be applied in the present invention. In some embodiments, confocal images

are recorded on an automated fluorescent confocal microscope Opera™ (Evotec) as described in the EXAMPLE. Each image are then processed using a dedicated image analysis software. In some embodiments, the screening cells (e.g. Raw267.4 cells) are stained with the potential-sensitive fluorochrome for a sufficient time. Then the extracellular dye is then washed away and image acquisition is performed (T1). The test compound is then added to the assay plate, which is incubated for an additional sufficient time. A second image acquisition is then performed (T2). Automated image analysis determined the average intensities for each well and the intensity ratio is calculated ($[T2_{int}] / [T1_{int}]$). Accordingly, in some embodiments, the screening method of the present invention comprises the steps of i) labeling the screening cells with the potential-sensitive fluorochrome into contact with screening cells of the present invention previously, ii) determining the fluorescence intensity $[T1_{int}]$ of the screening cells, iii) bringing the screening cells into contact with the test compound, iv) determining the fluorescence intensity $[T2_{int}]$ of the screening cells, v) calculating the intensity ratio $[T2_{int}] / [T1_{int}]$ and vi) selecting the test compound when the intensity ratio is inferior to 1 (<1). In some embodiments, the intensity ratio is compared with the intensity ratio determined for a compound of reference (e.g. myco lactone), wherein when the intensity ratio determined for the test compound is about the same or inferior to the intensity ratio determined for the compound of reference, then the test compound is selected. In some embodiments, step i) is performed in presence of a blocker of AT2R or TRAA well known in the art (e.g. a siRNA specific for AT2R or TRAAK) and when the intensity ratio is equal or superior to 1 then it is concluded that the test compound (for which a decrease in the intensity ratio was previously determined) is a specific agonist of angiotensin II receptors (AT2Rs)- TWIK-related arachidonic acid stimulated K⁺ channel (TRAAK) pathway.

Typically, the test compound of may be selected from the group consisting of peptides, peptidomimetics, small organic molecules, antibodies, aptamers or nucleic acids. For example the test compound according to the invention may be selected from a library of compounds previously synthesized, or a library of compounds for which the structure is determined in a database, or from a library of compounds that have been synthesized de novo. In some embodiments, the test compound may be selected form small organic molecules. As used herein, the term "small organic molecule" refers to a molecule of size comparable to those organic molecules generally sued in pharmaceuticals. The term excludes biological macromolecules (e.g.; proteins, nucleic acids, etc.); particular small organic molecules range in size up to 2000 Da, and most typically up to about 1000 Da. The screening methods of the invention are very simple. It can be performed with a large number of test compounds, serially or in parallel. The method can be readily adapted to robotics. For example, the above assays may be performed using high throughput screening techniques for identifying test compounds for developing drugs that may be useful to the treatment or prevention of pain. High throughput screening techniques may be carried out using multi-well plates (e.g., 96-, 384-, or 1536-well plates), in order to carry out multiple assays using an automated robotic system. Thus, large libraries of test compounds may be assayed in a highly efficient manner. More particularly, stably-transfected cells growing in wells of micro-titer plates (96 well or 384 well) can be adapted to high through-put screening of libraries of compounds. Compounds in the library will be applied one at a time in an automated fashion to the wells of the microtitre dishes containing the transgenic cells described above.

In some embodiments, the test compounds that have been positively selected may be subjected to further selection steps in view of further assaying its properties in vitro assays or in an animal model organism, such as a rodent animal model system, for the desired

therapeutic activity prior to use in humans. Any well-known animal model may be used for exploring the *in vivo* therapeutic effects of the screened test compounds. For example, the therapeutic activity of the screened test compounds can be determined by using various experimental animal models of pain known in the art such as those described in the EXAMPLE (e.g. Pain Receptive Assay). Once again the screened test compound may be compared to a reference compound such as a well-known analgesic or the mycolactone toxin. If the screened test compound provide the same effects or even better effects than the reference compound, said test compound could be typically selected for clinical investigation.

EXAMPLE: Material & Methods Bacterium

M. ulcerans (strain no. 1615) was originally isolated from a skin biopsy of a human patient from Malaysia (George et al., 1999) The recombinant *M. ulcerans*-GFP bacterium (strain no. JKD8083) was derived from an Australian strain in which green fluorescent protein (GFP) expression is controlled by the *mis* SigA-like promoter (Tobias et al., 2009).

Mycolactones

Mycolactones were purified from *M. ulcerans* (strain 1615) extracts as previously described (George et al., 1999). Mycolactone purity was estimated to be better than 98%, based on HPLC profiles. Mycolactone was diluted to 4 mg/mL in absolute ethanol and stored in the dark in amber glass tubes. Synthesis of mycolactone was described elsewhere (Gersbach et al, 2011; Scherr et al, 2013). Synthetic mycolactone was diluted to 500 ng/mL.

Animal Experimentation

AT2Rknockout mice were generated and provided by L. Hein (Hein et al, 1995). Six-week-old female FV BN wild-type (Charles River France, <http://www.criver.com/ico>) and AT2Rknockout (Hein et al., 1995) mice were maintained under conventional conditions in the animal house facility of the Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France (Agreement A 49 007 002), adhering to the institution's guidelines for animal husbandry. Mouse Models

For inoculation with *M. ulcerans*, fifty microlitres of a suspension containing 5×10^4 bacteria were injected subcutaneously into the left footpads of mice. For inoculation with mycolactone, five micrograms of mycolactone diluted in 10 μ l of ethanol were injected subcutaneously into the left footpads of mice. In controls, 10 μ l of absolute ethanol alone were injected into the left footpads.

Pain Receptive Assay

The pain receptive assay was performed by adapting the tail-flick procedure, using the tail-flick Unit (UGO BASILE). The sensitivity of the tissue to a noxious thermal stimulus was measured. The radiant heat stimulus was focused on the left footpad. The assay was performed twice each week on mice that had been previously anesthetized. This assay was validated by local application of Emla® analgesic cream containing 5% lidocaine/prilocaine (Astra Zeneca).

Immunocytochemistry

After sacrifice, footpads were removed, frozen in isopentane cooled to -30°C , and stored at -80°C . Frozen tissues were serially sectioned using a Leica cryostat. Sections ($12\ \mu\text{m}$) were fixed in cold methanol for 10 min and washed 3 times in PBS before blocking at room temperature for 1 hour in BSA 5%. Sections were incubated overnight with Texas red-conjugated anti-B3 tubulin antibody (Sigma) diluted 1/200 in PBS with 5% BSA and then rinsed with PBS (3 x 5 minutes). The preparations were counterstained with $3\ \mu\text{M}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma) for 5 min and washed twice with PBS. Slides were mounted with an anti-fading solution and observed with a confocal microscope (LSM, Leica). Tissues from 7 mice per stage were analysed, with 50 slides per mouse.

Mouse Sciatic Nerve Sections for Transmission Electron Microscopy

After deep anaesthesia, a perfusion with phosphate buffer was performed after section of the femoral artery. Fixation of the tissue was then performed with a second perfusion with 4% paraformaldehyde and 0.1 % glutaraldehyde in phosphate buffer fixation. The sciatic nerve was subsequently isolated by dissection. The samples were fixed for 30 min in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) containing 2.5% glutaraldehyde for 1 h at 4°C and left to stand for 12 h at 20°C in cacodylate buffer. Specimens were progressively dehydrated and embedded in Araldite (Fluka). After dehydration, thin sections were stained with uranyl acetate and Reynold's lead citrate and then examined on a JEOL 120 EX electron microscope.

Cell Culture

Macrophage cells (Raw264.7, ATCC TIB-71) were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (Invitrogen). Pheochromocytoma cell 12 (PC 12) cells were plated on collagen IV-coated culture dishes in DMEM supplemented with 10% horse serum and 5% foetal bovine serum. After 6 days, differentiation to a neuronal phenotype was induced by incubation in DMEM supplemented with 2% horse serum, 1% foetal bovine serum, and 100 ng/mL nerve growth factor (Invitrogen). The culture medium was changed every two days until differentiation was complete (6-7 days). Primary cultures of hippocampal neurons were prepared from neonatal (P0 to P2) BALB/c and FVB N mice according to an established protocol (Banker and Cowan, 1977) with minor modifications.

Electrophysiology

The membrane potential of PC-12 cells was recorded using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique in the current-clamp mode. PC-12 cells were grown for 7 days on glass coverslips before being harvested. After an overnight incubation, the glass coverslips were transferred into a recording chamber and continuously superfused with Ringer's saline buffer containing 125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl₂, 1.25 mM NaH_2PO_4 , 26 mM NaHCO_3 , 12 mM glucose, buffered to pH 7.4, at $30\text{-}32^{\circ}\text{C}$ and bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 . Recording pipettes (3-5 MW resistance) were filled with 140 mM potassium gluconate, 5 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 1.1 mM EGTA, 5 mM HEPES, 4 mM MgATP, 0.3 mM NaGTP and titrated to pH 7.2 with KOH. Membrane potential changes were

monitored using an EPC10 quadra USB patch-clamp amplifier and PATCHMASTER software (HEKA Elektronik, Germany). Signals were sampled at 10 Hz, filtered at 3 kHz and analysed with FITMASTER software (HEKA Elektronik). Cells were current-clamped close to their resting potential (-55 to -65 mV in average). Membrane potential was continuously monitored for 10- 20 min before and 10-20 min after myco lactone application at 1.4 g/mL using a pneumatic drug ejection system (PDES, npi electronic GmbH, Germany). Control cells were stimulated with 2% ethanol as vehicle. For IC50 determinations for TRAAK, defolliculated *Xenopus* oocytes were injected with 50 nL of cRNA at 0.02-0.4 µg/µL encoding either mTRAAK and recorded 2-4 days later. For electrophysiology, single oocytes were placed in a 0.3-mL perfusion chamber and impaled with two standard microelectrodes (1-2.5 MΩ resistance) filled with 3 M KCl and voltage clamped with a Dagan CA-1 amplifier, in ND96 solution (96 mM NaCl, 2 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5 mM Hepes, pH 7.4 with NaOH). Stimulation of the preparation, data acquisition, and analysis were performed using pClamp software (Axon Instruments). Cell-based Fluorescence Assay, Image Acquisition by Automated Confocal Microscopy and Data Analysis

aw264.7 macrophages were harvested with Versene (Gibco™) and seeded at a density of 10⁴ cells per well in 384-well plates (Evotec, Hamburg, Germany) in 50 µl RPMI 1640 supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (all from Invitrogen). After overnight incubation, the medium was removed, and the cells were labelled for 2 hours at 37°C with bis-(1,3-diethylthiobarbituric acid) trimethine oxonol (DiSBAC2(3), Invitrogen, B413) at 62.5 g/mL. The cells were then washed three times with imaging buffer containing 150 mM NaCl, 5 mM Cl₁, 10 mM HEPES, 2 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5.5 mM glucose, 2.9 mM sucrose. A first series of image acquisition was conducted to ascertain the proper labelling of the cells (T1int); myco lactone was then added to the cells. After 20 minutes incubation at room temperature under mild shaking (500 rpm), a second scan was performed to measure the intensity of the fluorescence of the cells (T2int). Confocal images were recorded on an automated fluorescent confocal microscope Opera™ (Evotec) using a 20X water objective (NA 0.70), 532-nm laser and 600-nm camera. Four fields per well were recorded. Each image was then processed using dedicated in-house image analysis software (IM). The image dynamics were checked through a series of statistical tests (assessing notably average intensities and standard deviations), designed to allow the removal of black or out-of-focus images. DiSBAC2(3) staining was then segmented in the "DiSBAC stain" band using an in-house method (Fenistein et al., 2008), and the ratio of the surface intensity of the "DiSBAC stain" before and after myco lactone addition was determined for each well. This ratio is referred to as the Ratio [T2int/T1int].

Competitive Binding of Mycolactone to the Human AT2R

[¹²⁵I]CGP 42,112A at 0.01 nM and were used as agonist radioligand. Radioactivity was detected by scintillation counting (Cerep Inc, Seattle, WA, Assay Reference 0026). The radioligand was first incubated with membranes from human recombinant HE -293 cells and the bound radioactivity was measured. The membranes were then incubated with a high concentration of angiotensin II (1 µM) and with [¹²⁵I]CGP 42,1 12A radioactive ligand to determine non-specific binding of the ligand to the AT2R receptor. The radioligand and the mycolactone (8 different concentrations) were incubated with the cell membranes for 4 h at 37°C to determine the IC50 of the mycolactone. Chemical Reagents

Tetraethylammonium (TEA), an inhibitor of various potassium channels and Piroxicam, a highly active inhibitor of prostaglandin were from Sigma. EMLA cream containing 5% lidocaine and prilocaine anaesthetics was from Astra Zeneca. FR122047, a selective inhibitor of COX-1 signalling and PD123,319, a selective inhibitor of AT2R signalling were from Tocris Bioscience. For the mouse study, 200 (daily renewed) solution of piroxicam at 0.5 mg/mL in 1 % gelosed water was administered by gavage every day starting 30 days after *M. ulcerans* inoculation. Osmotic mini-pumps (AlzetVR model 2002, Palo Alto, CA) containing PD123,319 were implanted subcutaneously under anaesthesia in the back of the neck of mice 30 days after *M. ulcerans* inoculation, with a delivery rate of 20 mg/kg/day in water.

Results

M. ulcerans Induces Hypoesthesia in Early Stages of Oedema

We developed a mouse model to assess the relationship between hypoesthesia and nerve degeneration under low dose conditions of *M. ulcerans* infection. *M. ulcerans* was injected into the footpads of mice, and hypoesthesia was monitored with the pain receptive tail- flick assay at different time points. Under such conditions, mice exhibited redness at day 35 post-infection and oedema at day 4 . At both time points, hypoesthesia was observed in *M. ulcerans*- fected animals, with a significant tail- flick latency of 4 seconds, as compared to non-infected controls (Figure 1A). Histological analysis of mice inoculated with *M. ulcerans* expressing green fluorescent protein (GFP) showed the presence of bacilli around the inoculation site, both in the stages of redness and oedema (Figure 1B). On the other hand, no GFP bacilli were found in nervous tissue, either in glial cells or in axons. Macroscopic and ultrastructural inspection revealed no signs of nerve degeneration (Figure 1C, 1D). Similarly, extensive examination of more than 480 Remak fibres showed no differences between *M. ulcerans* -infected footpads and non-infected controls at the level of cytoskeletal cell composition, organisation of microtubules and filaments, structure of unmyelinated axons or size of Schwann cell nuclei (Figure 1C, 1D). Finally, no obvious anomalies were observed in the infected footpads at the level of myelinated or C-fibres involved in sensory information transmission (Besson, 1999; Griffin and Thompson, 2008). Taken together, these results demonstrate that hypoesthesia in *M. ulcerans* infection is not attributable to nerve degeneration, at least in this mouse model.

We next investigated the effect of direct inoculation of purified mycolactone on hypoesthesia and nerve damage. Used as control, lidocaine induced a transient hypoesthesia in our model shortly after injection. Low doses of mycolactone produced sustained analgesia for up to 2 days (Figure 1E). Noticeably, nociceptive abilities were recovered after 8 days. Under these conditions, as for *M. lcerans*-mfected samples, we performed a close inspection of emak fibres observing again that the Schwann cells were intact (Besson, 1 99; Hoeijmakers et al., 2012). Thus, mycolactone injection alone is sufficient to produce hypoesthesia without nerve damage. Further, we also tested chemically synthesized mycolactone, to rule out possible effects of contaminants in our preparation of purified mycolactone. The synthetic mycolactone induced the same level of reversible hypoesthesia as the purified toxin, with the same concentrations and application durations. This result clearly demonstrates that the observed analgesic effect is attributable to the mycolactone toxin (Figure 1E).

Mycolactone Induces Hyperpolarization of Neurons

With this hypothesis of nerve degeneration to account for hypoesthesia ruled out, it was natural to ask whether mycolactone could instead produce hypoesthesia by interfering with relevant neural transmission pathways. To this end, we examined the effect of mycolactone on membrane potential in neurons derived from PC 12 cells using the patch-clamp technique in the current-clamp mode. Upon local and continuous application, mycolactone induced a slowly developing cell hyperpolarization. As compared to vehicle-treated neurons, an average decrease of - 10 mV in the membrane potential was observed after 20 minutes of incubation with purified mycolactone at sub toxic doses (Figure 2A, 2B). The same membrane potential change was also observed with the synthetic mycolactone, at the same concentration. After removal of the toxin, the cells recovered their resting membrane potential, displaying signal intensities similar to those before addition of toxin. As a matter of fact, such reversibility of the effect of mycolactone also supports the conclusion relative to the absence of neuronal damage (Figure 2C). For enhanced characterization, we next developed an image-based phenotypic assay based on the monitoring of mycolactone-induced hyperpolarization. More specifically, neurons were loaded with the voltage-sensitive fluorescent bis-oxonol probe DiSBAC2(3) (DallAsta et al, 1997) and exposed to mycolactone. In this assay the cell fluorescence decreased within 20 minutes (Figure 2C), with the cells exhibiting the same type of slowly developed hyperpolarization as the one observed by electrophysiological recordings of membrane potentials. Accordingly we decided to monitor the effect of toxin at 20 minutes in the following experiments. For image- based quantification of the samples, the DiSBAC2(3) signal was recorded before addition of toxin and 20 minutes after ([T_{1int}] and after [T_{2int}], respectively), and the intensity ratio [T_{2int}/T_{1int}] was calculated. Such quantification of the samples showed that 40% of the signal intensity was lost in the presence of 0.175 ng/nL mycolactone (Figure 2D). Hyperpolarization is typically associated with K⁺ channels, and we checked that such channels were involved in the mycolactone-induced hyperpolarization. To this end we treated cells with the two ⁺ channel blockers tetraethylammonium (TEA) and barium chloride (BaCl₂). As shown in Figures 2E and 2F, TEA and BaCl₂ abolished the mycolactone-mediated hyperpolarization demonstrating that it is mediated by K⁺ efflux. At this level, the analgesic action of mycolactone appears to share common features with the non-opioid analgesic flupirtine, which also hyperpolarises neurons by activation of ⁺ channels (Szelenyi, 2013). Furthermore, the ⁺ channels involved in the mycolactone-mediated hyperpolarization appear to be sensitive to TEA and BaCl₂ only at relatively high concentrations (above 10 mM and 1 mM, respectively), suggesting that they belong to the K_{2P} channel family (Noel et al., 2011; Sandoz et al, 2012).

Identification of AT₂R as the Target Receptor for Mycolactone Involved in Cell Hyperpolarization

To further elucidate the cellular and molecular mechanisms underlying the action of mycolactone we sought to identify its target receptor involved in the K⁺ mediated hyperpolarization. To this end we adapted the assay above to the large-scale screening of a siRNA library targeting 8,000 different host genes. Macrophage-like cells of the Raw267.4 cell line were used in this screening as they are efficiently silenced by siRNAs (Carralot et al., 2009). We first checked that the effect of mycolactone on hyperpolarization in Raw267.4 cells is the same as in neurons. For the screening experiments cells were first incubated with siRNA and then loaded with DiSBAC2(3) immediately before the addition of mycolactone. A

decreased intensity ratio was observed after the addition of toxin to cells that had been incubated with non-target (scrambled) siRNAs. The most significant hits (roughly 1% of the total) were selected from the primary screen, leading to 34 siRNA-targeted genes upon retesting. In this set only three genes appeared to be associated with receptors, namely IL23R, ICAM1 and AGTR2. With this respect, it is noticeable that no genes encoding opioid receptors, common target of analgesics, were found among the most significant hits from the siRNA screen. Whereas ICAM1 and IL23R, belonging respectively to the immunoglobulin and interleukin receptor families, do not appear to be associated in any direct-known way with nociceptive pathways, the angiotensin II type 2 receptor (AGTR2 or AT2R) represented a favourable candidate to account for the observed analgesia effects. This receptor has been reported recently, in a completely different context, to be specifically involved in nociception in the course of experiments testing the effects of the AT2R chemical antagonist PD 123,319 (Anand et al., 2012). Accordingly we focused our subsequent investigations on AT2R receptors. First, we checked that silencing AT2R led to a high ratio value comparable to that of the scramble control in the absence of toxin (Figure 3A). We then proceeded to investigate in detail the potential role of AT₂R as a mediator of mycolactone-mediated hyperpolarization, seeking to fully characterize and decipher the associated pathway. As a first direct characterization, we showed that neurons isolated from AT2R knockout (AT2R-^{-/-}) mice (Hein et al., 1995) were not hyperpolarized upon addition of mycolactone, with no observed decrease in DiSBAC2(3) signal (Figure 3B). Furthermore, we assessed in vitro the binding affinity of the mycolactone toxin to human AT2R, which displays 95% amino acid sequence identity with murine AT2R. Binding affinity of mycolactone to AT2R was determined in a radioligand competition assay using the agonist [¹²⁵I] CGP42,112A (Pelegri-da-Silva et al., 2005). Mycolactone was able to inhibit the AT2R agonist with an IC₅₀ value of 3 µg/mL (Figure 3C). We further analysed the expression of AT2R in our settings and found that AT2R was expressed in mouse footpad. In this assay, infection with *M. ulcerans* did not change any significantly the level of expression of AT2R, showing that AT2R is not upregulated after infection. To further pinpoint the causal role of mycolactone in cell hyperpolarization via AT2R receptors we performed two additional assays. First we showed that the AT2R-selective antagonist PD 123,319 inhibits mycolactone-induced hyperpolarization in neuronal cells (Figure 3D). In addition, it is known that AT2R is a G-protein-coupled receptor, which couples selectively to pertussis toxin (PTX)-sensitive G_{i2} and G_{i3} proteins (Kang et al., 1994; Summers and Gelband, 1998). Upon pre-incubation of the cells with the G-protein inhibitor PTX (Figure 3E) we showed that mycolactone-mediated hyperpolarization was abolished, thus demonstrating that G-proteins are involved in mycolactone-induced AT₂R signalling. In conclusion, inhibition of mycolactone signalling in absence of AT2R was demonstrated through three different approaches, relying on chemical inhibition, genetic knock-down as well as genetic knock-out. We further checked whether mycolactone could also signal through AT₁R, as is the case for angiotensin II. As a matter of fact mycolactone displayed binding affinity to the human AT₁R similar to that measured for AT2R. Accordingly, we tested the effect of mycolactone in an AT₁R functional assay whereby cytosolic Ca²⁺ ion mobilization is measured in HEK-293 cells expressing AT₁R. No effect of mycolactone was observed in this assay, up to 20 µg/mL, showing that despite its binding on the receptor mycolactone does not trigger AT₁R activation. Confirming this result, we showed that mycolactone signaling was abolished in neurons from mice KO for AT2R (Clere et al., 2010; Hein et al., 1995) not impaired for AT₁R expression, thus excluding a role for AT₁R in mycolactone-induced hyperpolarization. AT2R Induces Cell Hyperpolarization via Cyclooxygenase Pathway

To dissect the mycolactone-induced pathway at the molecular level, we performed a series of additional analyses of our siRNA data, complemented by the screening of a chemical library of inhibitors with known targets. Based on the identification of the AT₂R target above, the rationale in this two-pass screening approach was to reanalyse the siRNA data, with a significantly relaxed threshold, in order to further identify relevant genes involved in the underlying pathway seeking notably to bridge the gap between the AT₂R-input and + channels-output levels. In this second-pass screening the analyses were conducted in the light of information available in the literature, concerning various alternative pathways associated with the activation of AT₂R. As a matter of fact it was documented in the literature that modulation of + currents by AT₂R signalling can follow several different intracellular pathways (Nouet and Nahmias, 2000). The primary reported pathway involves the protein PTPN6-SHP1, which becomes phosphorylated upon AT₂R activation (Bedecs et al, 1997). In our cellular model, it was possible to exclude this pathway for AT₂R mediated signalling because addition of mycolactone did not result in any notable variation in the amount of phosphorylated SHP 1. Another reported pathway for AT₂R modulation of K⁺ currents involves signalling through activation of phospho lipase A2 (PLA2) and release of arachidonic acid (AA) (Lauritzen et al., 2000). We showed that the AT₂R-mediated signalling of mycolactone is consistent with this pathway. More precisely, we were able to dissect in detail the triggering of this pathway by mycolactone and to assess the effects of the enzymes involved in the biosynthesis and metabolism of AA. We found that mycolactone-induced hyperpolarization was inhibited upon silencing of several PLA2 homologues that mediate the release of AA from membrane phospholipids (Figure 3F). Mycolactone signalling was also impaired upon silencing of COX-1 (PTGS1), which converts AA into prostaglandins (Fletcher et al., 2010) (Figure 3F). We showed that inhibition of PTGS1 by the chemical inhibitors FR122047 and Piroxicam abolished mycolactone-mediated hyperpolarization (Figure 3G). As Piroxicam is a nonselective COX inhibitor, we further wanted to investigate the possible involvement of COX-2 in this pathway. Accordingly, we tested COX-2 inhibition either by silencing the expression of PTGS2 or by using COX-2 selective inhibitors (DuP-697 and NS398). In both cases we observed no effects in our assay, thus ruling out a putative role of COX-2 signaling in our scheme. Refined Characterization of the K⁺ Channels Subfamily

Beyond the detailed characterization of the molecular pathway between AT₂R-input and + channels-output, the second-pass reanalysis of our siRNA primary screen further allowed refining the characterization of the K⁺ channels in terms of subfamily assignment. More precisely such reanalysis allowed to pinpoint two possible candidate subfamilies to which the potassium channels involved in the mycolactone induced hyperpolarization belong, namely CNK4 (TRAAK) and KCNK13 (THIK1) from the K₂P channels family (Figure 3F). Channels from the K₂P family function as regulatory hubs for the generation of negative resting membrane potentials and therefore they constitute appropriate final targets of the signaling pathway involved in the mycolactone-induced hyperpolarization. As high concentrations of either Barium or TEA reversed the mycolactone-induced hyperpolarization, we wanted to investigate the ability of BaCb and TEA to block the activity of TRAAK. We showed that TRAAK is sensitive to TEA and BaCb with an IC₅₀ of 7 ± 2 mM and 0.5 ± 0.1 mM respectively. These IC₅₀ values are in good agreement with the concentration that provokes an inhibition of the mycolactone-induced hyperpolarization (Figure 2E and 2F). Accordingly we asked the question as to which mediator was involved in TRAAK activation. Based on the evidence above concerning the involvement of the cyclooxygenase pathway in the AT₂R- induced cell hyperpolarization, it was natural to consider first a possible direct role for arachidonic acid, known to activate TRAAK channels. However we could rule out this

possibility, as PTGS1 inhibitors abolished mycolactone-induced hyperpolarization. Accordingly we reasoned that the mediator responsible for the activation of TRAAK channels could correspond to one of the metabolites of arachidonic acid. With this respect, the analysis of our screen data identified only one relevant candidate, namely the enzyme prostaglandin E synthase 2 (PTGES2) (Figure 3F). Application of PGE2, the synthesis of which is catalyzed by Ptges2, induced a 4.1 ± 0.8 fold increase of the TRAAK current showing that release of potassium via TRAAK can be mediated by PGE2 (Figure 3H). Altogether these results are consistent with a model in which the mycolactone-induced pathway, via AT2R at the input level, results in an increased activity of TRAAK potassium channels at the output level, with the intermediate pathway as detailed above.

Blockage of the AT2R Signalling Cascade Results in Inhibition of Hypoesthesia caused by Mycolactone

Completing the rationale for this molecular characterisation, we further demonstrated its physiological relevance by investigating *in vivo* the causal role of AT2R in hypoesthesia. We first verified that AT2RS are not expressed in neurons in our KO model (Hein et al., 1995) (Figure 4A). When mycolactone was injected into the footpads of AT2R KO mice, the animals exhibited unaltered pain sensitivity in the tail-flick test, with an average response time of 8 seconds, which contrasted with a delayed response by an average of 12 seconds in wild-type animals (Figure 4B). Thus, AT2R expression is critical for the occurrence of mycolactone-mediated hypoesthesia under physiological conditions. This result was substantiated by the tail-flick test on wild-type and AT2R-KO mice that presented non-ulcerative lesions after infection with *M. ulcerans* (Figure 4C). In addition, upon treating *M. ulcerans*-infected mice exhibiting oedema with the selective AT2R blocker PD123,319 or with piroxicam, an inhibitor of prostaglandin synthesis by PTGS 1, we observed the same pain-sensitive phenotype as in the AT2R-KO animals (Figure 4D, 4E). Taken together our results demonstrate the pivotal role of AT2R signalling cascade in buruli ulcer induced hypoesthesia.

Mycolactone triggers TRAAK activation in heterologous system

As shown in Figure 6A and B, Mycolactone is able to induce a 3 fold increase of the TRAAK current obtained from HEK cells expressing AT2R and TRAAK channel. It is worth to note that Mycolactone has no effect on TRAAK current in the absence of AT2R. In addition, the TRAAK current density shows no modification induced by AT2R expression showing that the AT2R has no basal activity for the AT2R- TRAAK pathway.

Mycolactone triggers a very specific signaling to activate TRAAK

Importantly, we showed that mycolactone-dependent activation of AT2R receptor induces a K⁺-TRAAK dependent hyperpolarization, as a difference from the action of the compound C21 for which we did not observe TRAAK activation (Figure 7A&B) but we observed a diminution of the TRAAK current which is translated in a depolarization of the membrane potential of the cell. These results demonstrate that AT2R activation by Mycolactone triggers a very specific signaling involving TRAAK.

TREK1 is not sensitive to AT2R activation by Mycolactone.

We further asked the question whether TREK1, which belongs to the same channel subfamily as TRAAK, sharing a high degree of homology with TRAAK, could be activated by Mycolactone. We showed that TREK1 is not sensitive to AT2R activation by Mycolactone (Figure 8, $P > 0.8$), thus the role of TREK1 in our system will not be investigated any further. In addition, as TREK1 is known to be activated through a canonical GiPCR pathway, the absence of regulation in our system provides an additional argument to rule out a major contribution of a classical G protein pathway.

Thus these recent results taken together further give weight to our working model concerning a very specific complex formed by AT2R and TRAAK. In such context it appears reasonable to hypothesize that the AT2R-TRAAK signaling pathway may require a particular spatial organization localized at the plasma membrane that we will further investigate.

Discussion:

The focus of the work here is the molecular dissection of a previously unanticipated infection strategy employed by a bacterium that uses the mycolactone toxin as an effective analgesic to annul the pain of the lesions it causes. It was previously believed that absence of pain in Buruli ulcer disease could be attributed to nerve damage, caused by the action of the toxin mycolactone secreted by *M. ulcerans*. Accordingly we first revisited this hypothesis to test it in detail. We demonstrated, with purified as well as synthetic mycolactone, that the analgesic effect of the toxin was not accompanied by nerve degeneration. In addition, it is clear that *M. ulcerans* does not associate with nerve fibres and it is most likely that the toxin reaches neurons through diffusion. Indeed we have previously shown that the toxin mycolactone can be shuttled within vesicles in human lesions (Marsollier et al., 2007). In this background we endeavoured to explore alternative mechanisms, other than nerve damage, accounting for the analgesic effect of mycolactone. Instead we sought to investigate possible interference of the toxin with neural processes which could be involved in pain perception and we addressed the question of painlessness for early lesions that are not yet necrotic. It is likely that the effect of mycolactone on necrosis is relevant to yet another phenomenon (Guenin-Mace et al, 2013; Sarfo et al., 2013).

At a global level, we first demonstrated with electrophysiology that mycolactone, purified as well as synthetic, exerts a clear-cut effect on membrane potential, inducing hyperpolarization of neurons. Based on this result we then deployed a coherent, multifaceted approach, to unravel the detailed molecular pathway underlying this effect. In this approach we identified, at the input level, AT2R receptor as the target of mycolactone. We further confirmed this result by showing that mycolactone-induced hyperpolarization is inhibited upon blocking AT₂R expression. Similarly, we showed that at the output level hyperpolarization was mediated by + channels, and we further refined this characterization showing the specific involvement of TRAAK potassium channels. In order to gain a complete molecular picture of the effect of mycolactone, we further dissected the intermediate pathway between the input and output levels, showing that the intracellular pathway involved i) activation of phospholipase A2, ii) release of arachidonic acid by COX-1 and iii) activation of TRAAK by PGE₂. -Finally to firmly validate these findings on physiological grounds, we demonstrated the causal role in vivo of AT2 in hypoesthesia.

In a global context, it will be interesting in future studies to consider in more detail several aspects of the pathway underlying the hypoesthesia model above. Thus, concerning the binding of mycolactone to AT₂R, the observed difference between affinities measured *in vitro* and quantifications in tissues can seem at first surprising. However very little is known about the stability and the metabolism of the toxin *in vivo*, with the possibility that metabolites derived from the toxin being active on AT₂R (Scherr et al., 2013). The investigation of such possibility can then be of potential pharmaceutical relevance. With this respect it is also significant that a similar range of difference in concentrations between *in vitro* binding and cellular activity assays was previously reported for mycolactone in a completely different context (Guenin- Mace et al., 2013). Another intriguing aspect in our hypoesthesia model concerns the involvement of COX-1, whereas analgesic effect of NSAIDs was shown to be associated with the inhibition of COX-1. Such observations clearly identify COX-1 as central, multifaceted, player in the control of pain. Of course it will be highly informative to determine whether such different mechanisms could be associated with different types of pain. Also COX-1 is known to mediate anti-inflammatory effect in immune cells, raising the question whether the AT₂R- mediated analgesic effect could also involve other immune cells. As a matter of fact, our demonstration here of the effect of mycolactone on macrophages, again via AT₂R, raises the possibility that the toxin acts as a multi-target weapon. Even though the scope of the study here concerned neuron targets for hypoesthesia, future studies concerning macrophages should identify the underlying effects (such as anti-inflammatory) in the case of such targets.

Beyond the molecular and physiological characterizations, the findings here can be cast in more general perspectives relevant to the theme of counteracting pain on health-oriented grounds. It is particularly significant to notice that the pathway dissected here involves a natural effector that does not belong to the different classes of analgesics of common use today, such as paracetamol (or acetaminophen), opiate molecules such as morphine or non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAID) such as salicylates. Notably because of series of, more or less severe, secondary effects it is rather unanimously recognized that new potent analgesics, showing less adverse effects, are highly desirable. With this respect the perspective in connecting the understanding of the implementation of analgesia in natural systems, such as the one described here, to the rational development of medical pain-killing products does not appear to be unrealistic. Emerging, but as yet disparate, results of genetic as well as pharmacological studies in humans and rodents, point towards the critical involvement of various components of the pathway deciphered here in different steps of pain perception and alleviation. Thus, it is highly significant that recent studies aiming to identify rare genetic variants associated with pain sensation precisely pinpointed angiotensin pathways as being of critical importance in trait heritability for pain sensitivity (Williams et al., 2012). On the other hand AT₂R receptors have been pinpointed recently, in completely independent contexts, as important potential targets for several synthetic analgesic drugs. Thus AT₂R antagonist PD 123,319 (also called EMA200) was reported to be effective in a rat model of prostate cancer-induced bone pain (Anand et al., 2012; Muralidharan et al, 2014). This is further corroborated by the fact that other EMA derivatives, EMA300 and EMA401 alleviate neuropathic pain through AT₂R (Rice et al., 2014; Smith et al., 2013).

It is then well possible that various such results may fit into a coherent yet multifaceted model, inspired by the one developed here (Figure 5), with the perspective of developing a rational basis for the design and selection of efficient analgesic molecules, directly inspired by natural ones. On more immediate grounds and in terms of health policies, unmasking the

pathogenesis strategies of the *M. ulcerans* bacillus should contribute to a more knowledgeable attitude towards the disease and encourage patients to seek care in the early stages of infection.

REFERENCES:

Throughout this application, various references describe the state of the art to which this invention pertains. The disclosures of these references are hereby incorporated by reference into the present disclosure.

- Anand, U., Facer, P., Yiangou, Y., Sinisi, M., Fox, M., McCarthy, T., Bountra, C., Korchev, Y.E., and Anand, P. (2012). Angiotensin II type 2 receptor (AT(2) R) localization and antagonist-mediated inhibition of capsaicin responses and neurite outgrowth in human and rat sensory neurons. *Eur J Pain*.
- Asiedu, K., Sherpier, R., and Raviglione, M.C. (2000). Buruli Ulcer Mycobacterium ulcerans infection. W.H.O. Global Buruli Ulcer initiative. Report 2000 World Health Organisation Geneva Switzerland. Banker, G.A., and Cowan, W.M. (1977). Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. *Brain Res* 126, 397-342.
- Bedecs, ., Elbaz, N., Sutren, M., Masson, M., Susini, C., Strosberg, A.D., and Nahmias, C. (1997). Angiotensin II type 2 receptors mediate inhibition of mitogen-activated protein kinase cascade and functional activation of SHP-1 tyrosine phosphatase. *Biochem J* 325 (Pt 2), 449-454.
- Besson, J.M. (1999). The neurobiology of pain. *Lancet* 353, 1610-1615.
- Carralot, J.P., Kim, T.K., Lenseigne, B., Boese, A.S., Sommer, P., Genovesio, A., and Brodin, P. (2009). Automated high-throughput siRNA transfection in raw 264.7 macrophages: a case study for optimization procedure. *J Biomol Screen* 14, 151-160.
- Clere, N., Corre, I., Faure, S., Guihot, A.L., Vessieres, E., Chalopin, M., Morel, A., Coqueret, O., Hein, L., Delneste, Y., et al. (2010). Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis. *Int J Cancer* 127, 2279-2291.
- Coutanceau, E., Marsollier, L., Brosch, R., Perret, E., Goossens, P., Tanguy, M., Cole, S.T., Small, P.L., and Demangel, C. (2005). Modulation of the host immune response by a transient intracellular stage of Mycobacterium ulcerans: the contribution of endogenous mycolactone toxin. *Cell Microbiol* 7, 1187-1196.
- Dall'Asta, V., Gatti, R., Orlandini, G., Rossi, P.A., Rotoli, B.M., Sala, R., Bussolati, O., and Gazzola, G.C. (1997). Membrane potential changes visualized in complete growth media through confocal laser scanning microscopy of bis-oxonol- loaded cells. *Exp Cell Res* 231, 260- 268.
- En, J., Goto, M., Nakanaga, K., Higashi, M., Ishii, N., Saito, H., Yonezawa, S., Hamada, H., and Small, P.L. (2008). Mycolactone is responsible for the painlessness of Mycobacterium ulcerans infection (buruli ulcer) in a murine study. *Infect Immun* 76, 2002-2007.
- Fenistein, D., Lenseigne, B., Christophe, T., Brodin, P., and Genovesio, A. (2008). A fast, fully automated cell segmentation algorithm for high-throughput and high-content screening. *Cytometry A* 73, 958-964.
- Fletcher, J.I., Haber, M., Henderson, M.J., and Norris, M.D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer* 10, 147-156.
- George, K.M., Chatterjee, D., Gunawardana, G., Welty, D., Hayman, J., Lee, R., and Small, P.L. (1999). Mycolactone: a polyketide toxin from Mycobacterium ulcerans required for virulence. *Science* 283, 854-857.
- Gersbach, P., Jantsch, A., Feyen, F., Scherr, N., Dangy, J.P., Pluschke, G., and Altmann, .H. (2011). A ring-closing metathesis (RCM)-based approach to mycolactones A/B. *Chemistry* 17, 13017-13031.
- Goto, M., Nakanaga, K., Aung, T., Hamada, T., Yamada, N., Nomoto, M., Kitajima, S., Ishii, N., Yonezawa, S., and Saito, H. (2006). Nerve damage in Mycobacterium ulcerans- infected mice: probable cause of painlessness in buruli ulcer. *Am J Pathol* 168, 805-81 1.
- Griffin, J.W., and Thompson, W.J. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. *Glia* 56, 1518-1531.
- Guenin-Mace, L., Carrette, F., Asperti-Boursin, F., Le Bon, A., Caleechurn, L., Di Bartolo, V., Fontanet, A., Bismuth, G., and Demangel, C. (2011). Mycolactone impairs T cell homing by suppressing microRNA control of L-selectin expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12833-12838.
- Guenin-Mace, L , Veyron-Churllet, R., Thoulouze, M.I., Romet-Lemonne, G., Hong, H., Leadlay, P.F., Danckaert, A., Ruf, M.T., Mostowy, S., Zurzolo, C, et al. (2013). Mycolactone activation of Wiskott-Aldrich syndrome proteins underpins Buruli ulcer formation. *J Clin Invest* 123, 1501-1512.

- Hein, L., Barsh, G.S., Pratt, R.E., Dzau, V.J., and Obilka, B.K. (1995). Behavioural and cardiovascular effects of disrupting the angiotensin II type-2 receptor in mice. *Nature* 377, 744-747.
- Hoeijmakers, J.G., Faber, C.G., Lauria, G., Merckies, I.S., and Waxman, S.G. (2012). Small-fibre neuropathies—advances in diagnosis, pathophysiology and management. *Nat Rev Neurol* 8, 369-379.
- Johnson, P.D., Stinear, T., Small, P.L., Pluschke, G., Merritt, R.W., Portaels, F., Huygen, F., Hayman, J.A., and Asiedu, K. (2005). Buruli ulcer (*M. ulcerans* infection): new insights, new hope for disease control. *PLoS Med* 2, e108.
- Kang, J., Posner, P., and Summers, C. (1994). Angiotensin II type 2 receptor stimulation of neuronal K⁺ currents involves an inhibitory GTP binding protein. *Am J Physiol* 267, C 1389- 1397.
- Lauritzen, I., Blondeau, N., Heurteaux, C., Widmann, C., Romey, G., and Lazdunski, M. (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *EMBO J* 19, 1784-1793.
- Marsollier, L., Aubry, J., Coutanceau, E., Andre, J.P., Small, P.L., Milon, G., Legras, P., Guadagnini, S., Carbonnelle, B., and Cole, S.T. (2005). Colonization of the salivary glands of *Naucoris cimicoides* by *Mycobacterium ulcerans* requires host plasmatocytes and a macrolide toxin, mycolactone. *Cell Microbiol* 7, 935-943.
- Marsollier, L., Brodin, P., Jackson, M., Ordulakova, J., Tafelmeyer, P., Carbonnelle, E., Aubry, J., Milon, G., Legras, P., Andre, J.P., et al. (2007). Impact of *Mycobacterium ulcerans* biofilm on transmissibility to ecological niches and Buruli ulcer pathogenesis. *PLoS Pathog* 3, e62.
- Muralidharan, A., Wyse, B.D., and Smith, M.T. (2014). Analgesic Efficacy and Mode of Action of a Selective Small Molecule Angiotensin II Type 2 Receptor Antagonist in a Rat Model of Prostate Cancer-Induced Bone Pain. *Pain Med* 15, 93-110.
- Noel, J., Sandoz, G., and Lesage, F. (2011). Molecular regulations governing TREK and TRAAK channel functions. *Channels (Austin)* 5, 402-409.
- Nouet, S., and Nahmias, C. (2000). Signal transduction from the angiotensin II AT₂ receptor. *Trends Endocrinol Metab* 11, 1-6.
- Pelegri-da-Silva, A., Martins, A.R., and Prado, W.A. (2005). A new role for the renin-angiotensin system in the rat periaqueductal gray matter: angiotensin receptor-mediated modulation of nociception. *Neuroscience* 132, 453-463.
- Rice, A.S., Dworkin, R.H., McCarthy, T.D., Anand, P., Bountra, C., McCloud, P.I., Hill, J., Cutter, G., Kitson, G., Desem, N., et al. (2014). EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *Lancet*.
- Sandoz, G., Levitz, J., Kramer, R.H., and Isacoff, E.Y. (2012). Optical control of endogenous proteins with a photoswitchable conditional subunit reveals a role for TREK1 in GABA(B) signaling. *Neuron* 74, 1005-1014.
- Sarfo, F.S., Converse, P.J., Almeida, D.V., Zhang, J., Robinson, C., Wansbrough-Jones, M., and Grosset, J.H. (2013). Microbiological, histological, immunological, and toxin response to antibiotic treatment in the mouse model of *Mycobacterium ulcerans* disease. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2101.
- Scherr, N., Gersbach, P., Dangy, J.P., Bomio, C., Li, J., Altmann, K.H., and Pluschke, G. (2013). Structure-activity relationship studies on the macrolide exotoxin myco lactone of *Mycobacterium ulcerans*. *PLoS Negl Trop Dis* 7, e2143.
- Simmonds, R.E., Lali, F.V., Smallie, T., Small, P.L., and Foxwell, B.M. (2009). Myco lactone inhibits monocyte cytokine production by a posttranscriptional mechanism. *J Immunol* 182, 2194-2202.
- Sizaire, V., Nackers, F., Comte, E., and Portaels, F. (2006). *Mycobacterium ulcerans* infection: control, diagnosis, and treatment. *Lancet Infect Dis* 6, 288-296.
- Smith, M.T., Wyse, B.D., and Edwards, S.R. (2013). Small molecule angiotensin II type 2 receptor (AT₂R) antagonists as novel analgesics for neuropathic pain: comparative pharmacokinetics, radioligand binding, and efficacy in rats. *Pain Med* 14, 692-705.
- Summers, C., and Gelband, C.H. (1998). Neuronal ion channel signalling pathways: modulation by angiotensin II. *Cell Signal* 10, 303-311.
- Szelenyi, I. (2013). Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflamm Res* 62, 251-258.
- Tobias, N.J., Seemann, T., Pidot, S.J., Porter, J.L., Marsollier, L., Marion, E., Letournel, F., Zakir, T., Aзуolas, J., Wallace, J.R., et al. (2009). Mycolactone gene expression is controlled by strong SigA-like promoters with utility in studies of *Mycobacterium ulcerans* and buruli ulcer. *PLoS Negl Trop Dis* 3, e553.
- Torrado, E., Fraga, A.G., Logarinho, E., Martins, T.G., Carmona, J.A., Gama, J.B., Carvalho, M.A., Proenca, F., Castro, A.G., and Pedrosa, J. (2010). IFN-gamma-dependent activation of macrophages during experimental infections by *Mycobacterium ulcerans* is impaired by the toxin mycolactone. *J Immunol* 184, 947-955.
- Wansbrough-Jones, M., and Phillips, R. (2006). Buruli ulcer: emerging from obscurity. *Lancet* 367, 1849-1858.

Williams, F.M., Scollen, S., Cao, D., Memari, Y., Hyde, C.L., Zhang, B., Sidders, B., Ziemek, D., Shi, Y., Harris, J., et al. (2012). Genes contributing to pain sensitivity in the normal population: an exome sequencing study. *PLoS Genet* 8, e1003095.